

Proteinchemische und kinetische
Untersuchungen an der
Aminoacylase aus Schweineniere

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
WERNER KÖRDEL
aus Friedigerode

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

**Proteinchemische und kinetische
Untersuchungen an der
Aminoacylase aus Schweineniere**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

von

**WERNER KÖRDEL
aus Friedigerode**

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am 9. 6. 1976

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 6. 1976

Dekan:	Prof. Dr. G. Schmid
Berichterstatter:	Prof. Dr. Fr. Schneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Kindl

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider im Physiologisch-Chemischen Institut II der Philipps - Universität Marburg/Lahn in der Zeit von Januar 1974 bis Februar 1976 angefertigt.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider, danke ich für die Überlassung des Themas, die stete Förderung meiner Arbeit und für viele anregende Diskussionen.

Herrn Dr. H.G. Löffler danke ich für die Zusammenarbeit
bei immunologischen Untersuchungen und für zahlreiche
Diskussionen.

Fräulein G. Hohmann danke ich für tatkräftige technische
Assistenz.

Herrn Käss danke ich für die Anfertigung eines großen Teils
der Zeichnungen.

INHALTSÜBERSICHT

Seite

1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Geräte	3
2.2.	Chemikalien	5
2.3.	Reinigung des Enzyms	9
2.4.	Analytische Methoden	10
2.4.1.	Proteinbestimmung	10
2.4.2.	Aminosäureanalyse	10
2.4.3.	SH-Bestimmungen	12
2.4.4.	Diskelektrophorese	13
2.4.5.	Immunochemische Untersuchungen	13
2.4.6.	Molekulargewichtsbestimmungen	14
2.5.	Bestimmungen der Enzymaktivität	15
2.6.	Chemische Modifizierung des Enzyms	16
2.6.1.	Modifizierung der SH-Gruppen	16
2.6.2.	Reduktion von Disulfidbrücken	18
2.6.3.	Modifizierung mit 5-Diazo-1H-tetrazöl	18
2.6.4.	Oxidation mit N-Bromsuccinimid	21
2.6.5.	Nitrierung des Enzyms mit Tetranitromethan	21
2.6.6.	Acetylierung mit N-Acetylimidazol	23
2.6.7.	Modifizierung der Lysinreste	24
2.6.8.	Photooxidation mit Methylenblau	27
2.6.9.	Modifizierung der Histidine mit Diäthylpyrocarbonat	29
2.7.	Einfluß von Komplexbildner auf die Enzym- aktivität	29

3.	Ergebnisse	31
3.1.	Reinigung	31
3.2.	Proteinchemische Untersuchungen	32
3.2.1.	Reinheitskontrollen	32
3.2.2.	Molekulargewichtsbestimmung	33
3.2.3.	Aminosäureanalyse	35
3.2.4.	SH-Bestimmungen	36
3.3.	Funktion und Reaktivität der SH-Gruppen	37
3.4.	Vergleichende kinetische Untersuchungen mit N-Acylaminosäuren und Dipeptiden als Substrate	46
3.5.	Reaktionen des Enzyms mit DHT	54
3.6.	N-Bromsuccinimidoxidation	59
3.7.	Nitrierung der Aminoacylase mit TNM	62
3.8.	Funktion und Reaktivität der Lysinreste	67
3.9.	Acetylierung mit N-Acetylimidazol	72
3.10.	Photooxidation	74
3.11.	Reaktion der Histidinreste mit Diäthylpyro- carbonat	78
3.12.	Vergleichende Untersuchungen der Aminoacylase vor und nach Behandlung mit Chelatbildnern	79
4.	Diskussion	86
4.1.	Methodik	86
4.1.1.	Analytische Probleme	86
4.1.2.	Spezifität der Modifizierungsreagenzien	91
4.2.	Eigenschaften des Enzymproteins	92
4.3.	Substratspezifität der Aminoacylase	95

4.4.	Funktion und Reaktivität der Aminosäure:	98
	Cystein, Cystin, Tryptophan, Histidin, Lysin und Tyrosin	
4.4.1.	Cystein- und Cystinreste	98
4.4.2.	Tryptophanreste	101
4.4.3.	Tyrosinreste	104
4.4.4.	Lysinreste	107
4.4.5.	Histidinreste	108
4.5.	Vorschlag für den Mechanismus der enzymatischen Katalyse	109
5.	Zusammenfassung	113
6.	Literaturverzeichnis	115

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

CPDS	6,6'-(3,3'-Carboxypyridin)-disulfid
DEP	Diäthylpyrocarbonat
DHT	5-Diazo-1H-tetrazol
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Ellman's	
Reagenz	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
NAI	N-Acetylimidazol
NBS	N-Bromsuccinimid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TLCK	N-Tosyllsylchlormethylketon
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNM	Tetranitromethan
TPCK	N-Tosylphenylalanylchlormethylketon
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
VP	Vinylpyridin

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

SCHMIEDEBERG [1] berichtete als erster 1881 über die Aminoacylase, die er Hippurikase nannte, da das Enzym die Spaltung von Hippursäure in den Nieren katalysiert.

Ab 1949 bearbeiteten GREENSTEIN und Mitarbeiter die Aminoacylase aus Schweineniere. Die Autoren studierten die Stereospezifität des Enzyms und fanden, daß es nur L-Isomere der N-Acylaminosäuren spaltet. D-Aminosäurederivate werden nicht umgesetzt und hemmen auch nicht die Katalyse. In praktischer Hinsicht wurde die Aminoacylase dazu verwendet, reine L-Aminosäuren aus Racematen herzustellen [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Da die Aminoacylase einen sehr weiten Spezifitätsbereich hat, katalysiert sie die Spaltung vieler N-Acylaminosäuren mit Ausnahme von N-Acylasparaginsäure. Auf diese Aminosäure ist ein weiteres Enzym mit wesentlich engerem Spezifitätsbereich eingestellt. Beide Enzyme wurden mit Acylase I und Acylase II bezeichnet [8].

Die höchste bisher gefundene Aminoacylaseaktivität besitzen Schweinenieren; den höchsten Anteil findet man im Cytoplasma, dann folgen Mitochondrien und Kerne [9].

Weiter wurde die Substratspezifität eingehender untersucht. FU und BIRNBAUM [10] konnten zeigen, daß die N-Acylaminosäuren eine freie Carboxylgruppe besitzen müssen. Daher werden auch keine Tripeptide angegriffen. An dem Stickstoffatom der Amidgruppe darf das Wasserstoffatom nicht durch eine Methylgruppe ersetzt werden, während das α -H-Atom durch eine Methylgruppe ersetzt werden kann; eine Äthylgruppe ist bereits zu groß und verhindert die Spaltung [10].

FONES und LEE [11] untersuchten den Einfluß der Acylkomponenten und fanden, daß die enzymatische Spaltungsrate in folgender Reihenfolge steigt: Acetyl < Chloracetyl < Fluoracetyl < Trifluoracetyl. Je stärker die elektronenziehende Wirkung des Restes wird, umso stärker wird die Peptidbindung labilisiert und die Spaltung geht entsprechend leichter.

Erste Untersuchungen über den enzymatischen Mechanismus der Aminoacylase führten ÖTVOS und Mitarbeiter [12, 13] durch, indem sie die K_m -, K_i - und k_{cat} -Werte verschiedener N-Acyl-aminosäuren bestimmten. Sie stellten fest, daß wahrscheinlich ein nucleophiler Angriff an dem Carbonylkohlenstoffatom stattfindet und daß k_2 die geschwindigkeitsbestimmende Konstante der Katalyse ist.

BRUNS und SCHULZE [14] stellten als erste reine Aminoacylase her und bestimmten einige physikalische und chemische Eigenschaften des Enzyms.

Bisher war nur wenig über die Eigenschaften des Enzymproteins bekannt. Ebenfalls wurde noch nicht untersucht, welche Aminosäuren an der enzymatischen Katalyse beteiligt sind und auf welche Weise das Substrat durch das Enzym gebunden wird. Nur Hinweise waren vorhanden, daß bei der Katalyse eine SH-Gruppe beteiligt sein könnte.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit chemischen Untersuchungen des Enzymproteins, mit Funktion und Zustand der Aminosäuren: Cystein, Cystin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Lysin. Dabei wird der Einfluß der chemischen Modifizierung dieser Aminosäuren auf die Struktur des Enzymproteins und die katalytische Aktivität in Beziehung gesetzt. Ferner wird die Art der Bindung der Acylkomponente besonders mit

Dipeptiden und freien Aminosäuren untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse erlauben die Formulierung eines möglichen Mechanismus der Enzymkatalyse.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Spektralphotometer

BECKMANN ACTA III mit automatischem Probenwechsler,
ZEISS PMQ II mit T/E-Wandler und Potentiometerschreiber
METRAWATT RE 511,
HITACHI 101 und SERVOGOR - Schreiber S oder SB mit
logarithmischem Verstärker.

pH - Meter

RADIOMETER PHM 26 oder PHM 64 mit verschiedenen Einstab- und
Zweistabmessketten der Firma RADIOMETER, INGOLD und METROM.

Titriereinrichtung

Bestehend aus pH-Meter PHM 26, dem Titrator TTT 11, der
Motorbürette ABU 11 und dem Schreiber (Titrigraphen) SBR 2c
der Firma RADIOMETER, Kopenhagen. Im temperierbaren Elektro-
dengefäß mit 1 ml Inhalt wurde eine RADIOMETER Mikro-Zweistab-
Meßkette, bestehend aus der Glaselektrode G 2222C und der
Kalomelektrode K 4112 verwendet.

Thermostate

MGW LAUDA K 2 RD (Thermostat/Kyrostat) und
MGW LAUDA WB 20 S 8

Leitfähigkeitsmessung

Digitalmeter DIGI 610, WTW, Weilheim

Chromatographie - Ausrüstung

Glassäulen verschiedener Größe

Durchflußphotometer: Uvicord II der Firma LKB und Laboratory Data Control Mod. No 1522

Fraktionssammler: LKB Ultrorac mit LKB II 300 Ultrograd

Gradienten Mixer

Peristaltische Pumpen: LKB Peristaltic Pump Type 4912 A

LKB Perpex Peristaltic Pump 10 200

SERVA E 25, SERVA, Heidelberg

Flüssigkeitsszintillationszähler

PACKARD Tri Carb Modell 3003

Diskelektrophoresen

Analytische Diskelektrophoresen wurden mit einer von BLOEMENDAHL [15] beschriebenen Apparatur durchgeführt. Das Stromversorgungsgerät wurde von J. BALDUF, Marburg, gebaut.

Isoelektrische Fokussierung

Elektrofokussiersäule LKB 8101 (110 ml) mit Netzanschluß-
gerät LKB 3371

Gefriertrocknung

ULTRA KRYOMAT K 60 SDW, Meßgerätewerke LAUDA

Aminosäureanalysator

BECKMANN MULTICHROM B Flüssigkeits-Säulen-Chromatograph.

2.2. Chemikalien

Substrate und Inhibitoren

L-Tryptophan f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
DL-Norleucin p.A.	Serva, Heidelberg
DL-Norvalin p.A.	Serva, Heidelberg
DL- α -Aminobuttersäure puriss.	Fluka, Buchs
DL- α -Aminoisobuttersäure puriss.	Fluka, Buchs
L-Valin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Leucin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Phenylalanin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Alanin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Isoleucin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Glutamin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Glutaminsäure f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Glycin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
L-Threonin f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Gly - Gly p.A.	Serva, Heidelberg
Gly - Ala puriss.	Fluka, Buchs
Gly - Leu puriss.	Fluka, Buchs
Gly - Ser puriss.	Fluka, Buchs
Ala - Leu puriss.	Fluka, Buchs
Leu - Leu puriss.	Fluka, Buchs
Thr - Ala puriss.	Serva, Heidelberg
Leu - Ala puriss.	Fluka, Buchs
N-Chloracetylalanin	Synthese nach l.c. [2]
N-Acetylalanin	Synthese nach l.c. [2]
N-Acetylmethionin	Synthese nach l.c. [8]
N-Tosylalanin	Synthese nach l.c. [8]

Puffersubstanzen

Tris(-hydroxymethyl)aminomethan p.A.	Merck, Darmstadt
Bernsteinsäure p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumacetat p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat p.A.	Merck, Darmstadt
Dinatriumtetraborat p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat p.A.	Merck, Darmstadt

Modifizierungsreagenzien

Essigsäureanhydrid p.A.	Merck, Darmstadt
¹⁴ C-Essigsäureanhydrid	NEN Chemicals, Frankfurt
2,4,6,-Trinitrobenzolsulfonsäure p.A.	Serva, Heidelberg
N-Tosyl-L-phenylalanylchlormethan- hydrochlorid f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
N-Tosyl-L-lysylchlormethanhydrochlorid f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
5-Aminotetrazol purum	Fluka, Buchs
Natriumnitrit p.A.	Merck, Darmstadt
N-Bromsuccinimid purum	Fluka, Buchs
Tetranitromethan p.A.	Fluka, Buchs
1-Acetylimidazol f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Diäthylpyrocarbonat, rein	Serva, Heidelberg
Äthylendiamintetraessigsäure p.A.	Merck, Darmstadt
1,10-Phenanthroliniumchlorid p.A.	Merck, Darmstadt
Hydroxylamin x HCL p.A.	Merck, Darmstadt
Quecksilberacetat p.A.	Merck, Darmstadt

Cadmiumacetat p.A.	Merck, Darmstadt
Cobaltacetat p.A.	Merck, Darmstadt
Zinkacetat p.A.	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat p.A.	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol puriss.	Fluka, Buchs
L-Cystein f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
1,4-Dithioerythrit f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogensulfid	aus Laborbeständen
Jodacetamid purum	Fluka, Buchs
1,3-Dichlorpropanon-2 z. Syn.	Merck, Darmstadt
Chloracetonitril z. Syn.	Merck, Darmstadt
2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid	Merck, Darmstadt
Vinylpyridin z. Syn.	Merck, Darmstadt
N-Äthylmaleinimid f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Carboxypyridindisulfid	aus Laborbeständen
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	
reinst	Serva, Heidelberg

Reagenzien für die Elektrophoresen und die Molekulargewichts-
bestimmungen

Acrylamid reinst	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Serva, Heidelberg
N,N',N'',N'''-Tetramethyläthylendiamin	Serva, Heidelberg
Natriumdeocylsulfat	Merck-Schuchardt, München
Fluorescein-isothiocyanat, rein	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau	Serva, Heidelberg
Dextranblau 2000	Pharmacia, Uppsala

Sephadex G 25 und G 150	Pharmacia, Uppsala
Servacel DEAE Cellulose	Serva, Heidelberg
Ovalbumin	Boehringer, Mannheim
Hämoglobin v. Rind, reinst	Serva, Heidelberg
Katalase, f. anal. Zwecke (E.C.1.2.1.6.)	Serva, Heidelberg
β -Galaktosidase (E. coli) (E.C.3.2.1.23)	Boehringer, Mannheim
L-Asparaginase (E. coli) (E.C.3.5.1.1.)	Bayer, Wuppertal
Alkalische Phosphatase (Kälberdarm) (E.C.3.1.3.1.)	Boehringer, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase (Schweinemuskel) (E.C.1.1.2.3.)	Boehringer, Mannheim
Lysozym reinst (E.C.3.2.1.17.)	Serva, Heidelberg
Carboanhydrase (Rinderblut) rein (E.C.2.1.1.)	Serva, Heidelberg

Analytische Reagenzien

Ninhydrin p.A.	Merck, Darmstadt
Thioglykolsäure p.A.	Merck, Darmstadt
Ameisensäure 98 - 100% p.A.	Merck, Darmstadt
Perhydrol 30% H_2O_2 p.A.	Merck, Darmstadt
Methylcellulose z. Syn.	Merck, Darmstadt
Aminosäuretestgemisch (2,5 mM/AS)	Beckmann Instruments, München
Salzsäure suprapur	Merck, Darmstadt
Zinn-II-chlorid p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat p.A.	Merck, Darmstadt

Natriumacetat p.A.	Merck, Darmstadt
2,2'Thiodiäthanol p.A.	Merck, Darmstadt
Aquasol (Szintillator-Fertigcocktail)	NEN Chemicals, Frankfurt
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt

2.3. Reinigung des Enzyms

Das Ausgangsmaterial war eine Ammoniumsulfat-Suspension von Aminoacylase aus Schweineniere mit einer Aktivität von 34 U/mg Protein. Die Ammoniumsulfat-Suspension, die das Rohenzym enthält, wurde zentrifugiert und 2 g Protein wurden in 100 ml 10 mM TRIS-Puffer pH 7,3 gelöst und auf eine Sephadex G 150 Säule (10 x 110 cm) gegeben, die vorher mit dem obigen Puffer äquilibriert worden war. Um störende Effekte durch noch vorhandenes Ammoniumsulfat in der Proteinlösung zu vermeiden, erfolgte die Chromatographie an der Säule von unten nach oben. Nach etwa drei Tagen war der Lauf bei einem Durchfluß von etwa 100 ml/Stunde beendet. Dabei wurden 25 ml Fraktionen gesammelt. Die aktiven Fraktionen (ca. 1 l) wurden vereinigt und anschließend auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 15 cm) aufgetragen, deren Durchfluß 40 ml/Stunde betrug. Die Säule wurde wieder mit dem 10 mM TRIS-Puffer pH 7,3 äquilibriert. Mit 200 ml 50 mM TRIS-Puffer pH 7,3 wurde nachgespült und anschließend über 16 Stunden mit einem linearen Gradienten von 50 mM bis 200 mM TRIS-Puffer pH 7,3 eluiert. Dabei wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt, deren enzymatische Aktivität und Proteinkonzentration bestimmt wurden.

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. Proteinbestimmung

Um eine möglichst bequeme Bestimmung der Proteinkonzentration der Aminoacylase in Lösung zu erhalten, wurde das Enzym gegen einen 0,1 m Carbonatpuffer pH 8,5 dialysiert. Anschließend bestimmt man die Extinktion bei 280 nm. Nach der Hydrolyse von 1 ml der Enzymlösung konnte die Proteinkonzentration über die Aminosäureanalyse bestimmt werden. Die spezifische Extinktion $E_{1\text{ cm}}^1\%$ (280 nm) beträgt 13,5. Die Werte, die durch Lösen von lyophilisierter gereinigter Aminoacylase erhalten werden, lagen zum Teil etwas unter diesem Wert, da die gefriergetrocknete Aminoacylase immer noch Spuren Salz enthält. Ebenfalls Verwendung fanden die Mikrobiuretmethode [16] und die Methode nach LOWRY [17], die sich besonders für sehr kleine Proteinkonzentrationen eignet. Die Eichkurve wurde mit frisch bereiteten Reagenzien und einer, über die UV-Absorption eingestellten, Aminoacylaselösung aufgenommen.

2.4.2. Aminosäureanalyse

Die gegen aqua bidest. dialysierten Proben wurden in Hydrolyseröhrchen überführt und mit soviel 10 n HCl p.A. versetzt, bis eine Konzentration von 6 Mol/l erreicht war. Nach 10-minütigem sorgfältigem Begasen mit Argon spezial wurden die Röhrchen zugeschmolzen und im Trockenschrank bei 110°C im Normalfall 22 Stunden hydrolysiert. Zur Kontrolle hydrolysierten einige Analysen 16, 24, bzw. 36 Stunden. Nach Entfernung der Salzsäure am Rotationsverdampfer bei 40°C, nahm man die Pro-

ben in 2 bzw. 3 ml Probenauftragepuffer auf. Bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Aminoacylase diente ein Aminosäuretestgemisch der Fa. Beckmann zur Bestimmung der C-Werte. Bei den Modifizierungsversuchen wurden die Proben auf die Kontrollansätze bezogen. Als Puffer dienten die Standardpuffer für die 1 Säulen - bzw. 2 Säulen - Hydrolyse-methode nach [18].

Proben, bei denen Tryptophan bestimmt werden sollte, wurden nach MATSUBARA und SASAKI [19] 5 % Thioglykolsäure zugesetzt. Da trotz Thioglykolsäure bei der sauren Hydrolyse ein geringer Tryptophanverlust zu beobachten ist, wurde der "praktische" C-Wert für Tryptophan ermittelt, indem Papain und Asparaginase, Enzyme deren Aminosäurezusammensetzung bekannt ist, unter den gleichen Bedingungen wie die Aminoacylase hydrolysiert wurden.

Methionin konnte entweder mit Thioglykolsäureschutz bei der Hydrolyse und Thiodiglykolschutz (25 ml auf 5 l Puffer) bei der Aminosäureanalyse [18] oder nach Perameisensäureoxidation [20] der Probe als Methioninsulfon bestimmt werden.

Die Anzahl der Cystein- und Cystinreste der Aminoacylase wurden nach vorheriger Perameisensäureoxidation bestimmt. Um einen möglichst "praktischen" C-Wert für Cysteinsäure zu erhalten, wurden Asparaginase, Papain und ein Testgemisch aus Cystein, Glutaminsäure, Alanin und Glycin unter den gleichen Bedingungen wie die Aminoacylase oxidiert und hydrolysiert.

Analyse:

Verwendete Harze: Beckmann M 82 für die lange Säule und
Beckmann M 72 für die kurze Säule

Da sich zur Bestimmung von Tryptophan nur die kurze Säule

(Elution mit Citratpuffer pH 5,23, 0,35 m) eignet, wurden Analysen von modifizierter Aminoacylase, bei denen es auf eine Tryptophanbestimmung ankam, sowohl auf der kurzen Säule (Try, Lys, His, Arg) als auch auf der langen Säule durchgeführt. Da jedoch die Aminosäuren, die der erste Puffer eluiert, meistens von Modifizierungsreaktionen nicht erfaßt werden, wurde sofort mit dem zweiten Puffer eluiert und nach Phenylalanin bzw. Nitrotyrosin abgebrochen, da die basischen Aminosäuren mit Tryptophan auf der kurzen Säule bestimmt werden. Einwandfrei auswertbar blieben dann noch: Met, Ile, Leu, Tyr, Phe und Nitrotyrosin.

2.4.3. SH-Bestimmung

Zur Untersuchung der Zugänglichkeit der Cystein- oder Cystinreste der Aminoacylase wurde das Enzym mit Vinylpyridin (5×10^{-2} m) bei pH 8,0 nach [21] eine Stunde inkubiert und dann dialysiert. Nun wurden die Proben zum einen mit Thio-glykolsäure hydrolysiert und das entstandene Cystein-Vinylpyridin-Reaktionsprodukt S- β [4-pyridyläthyl]cystein auf der kurzen Säule bestimmt; zum zweiten wurde das mit Vinylpyridin inkubierte und dialysierte Enzym mit Perameisensäure oxidiert. Die Differenz zwischen der so bestimmten Menge an Cysteinsäure und der Menge der Cysteinsäure der Kontrolle ergab die Anzahl der mit Vinylpyridin reagierten Cysteine. S- β [4-pyridyläthyl]cystein, das zur Bestimmung des C-Wertes erforderlich war, entstand bei der Reaktion eines 100-fachen molaren Überschusses von Vinylpyridin auf eine abgewogene Menge Cystein.

Zur Bestimmung der mit DTE zugänglichen Cystine der Amino-

acylase wurde diese bei pH 8,0 zuerst 20 Minuten mit 5×10^{-3} m DTE vorinkubiert. Dann wurde ein 10-facher molarer Überschuß an Vinylpyridin (5×10^{-2} m) zugegeben, der mit dem DTE, den freien und entstandenen SH-Gruppen des Enzyms reagierte. Die Bestimmung erfolgte wieder über beide Wege. Für die Bestimmung des S- β [4-pyridyläthyl]cysteins auf der kurzen Säule mußte der Puffer entweder nach pH 5,4 verändert werden; dann wurde dieser Peak zwischen Ammoniak und Arginin eluiert, oder nach pH 4,95, dann wurde er erst nach Arginin eluiert. Im ersten Fall störte allerdings ein größerer NH_3 -Peak die Bestimmung, da die drei Peaks zu dicht beieinander lagen. So wurde hier nur der letzte Weg gewählt.

2.4.4. Diskelektrophorese

Die erforderlichen Gele und Puffer wurden nach den Vorschriften von MAURER [22] hergestellt. Anwendung fanden "System I" (Mittelporgel) und "System VI". Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau G 250. Entfärbt wurden die Gele mit einer Lösung von Methanol - Eisessig - Wasser: (5 % Methanol und 7,5 % Eisessig).

2.4.5. Immunochemische Untersuchungen

a). Immunisierung der Kaninchen [23]

Erwachsenen Kaninchen wurde ein Gemisch von 0,5 ml Aminoacylase (ca. 2 mg/ml) und 0,5 ml komplettes Freund'sches Adjuvans in die Hinterläufe i.m. injiziert. Nach vier Tagen wurde noch einmal die gleiche Menge subkutan injiziert. Eine Woche später erhielt das Kaninchen nochmals eine subkutane

Injektion von reiner Aminoacylase. Die Blutentnahme erfolgte aus der Ohrvene. Nach Gerinnung des Blutes erhielt man durch Zentrifugation das klare Antiserum.

b). Immundiffusion nach OUCHTERLONY [24]

Für den Immundiffusionstest nach OUCHTERLONY werden 2 % Agar purum in Barbiturat-Acetatpuffer nach [25] auf Objektträger gegossen. Nach dem Gelieren wurde der Test wie in [24] beschrieben durchgeführt. Nicht präzipitiertes Protein wurde mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, die Proben getrocknet und mit Coomassie Brillant Blau angefärbt.

c). Immunelektrophoresen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte auf $2,5 \times 7,5$ cm Objektträgern bei einer Feldstärke von etwa 4 Volt/cm. Anschließend diffundierte das Antiserum gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proben. Diese wurden dann wie oben beschrieben gewaschen und angefärbt [26].

2.4.6. Molekulargewichtsbestimmungen

Molekulargewichtsbestimmungen mit SDS - Elektrophoresen wurden nach WEBER und OSBORN [27] ausgeführt. Die Aminoacylase und die Referenzproteine wurden bei 37°C 2 Stunden im Inkubationspuffer (0,01 m Phosphat-Puffer pH 7,0), der 1 % SDS und 1 % 2-Mercaptoäthanol enthielt, vorinkubiert. Bei der Elektrophorese fand ein 7,5 % Polyacrylamidgel Verwendung.

Zum anderen unterwarf man die Aminoacylase und die Referenzproteine einer Perameisensäureoxidation nach HIRS [20]. Die Oxidation wurde bei 0°C in 2 ml Perameisensäure (1 ml 30 %

H₂O₂ und 9 ml 90 % Ameisensäure) über 5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde auf 10 ml mit Wasser verdünnt und die Proben gefrieretrocknet. Die Proben wurden im Puffer gelöst und auf die Röhrchen aufgetragen. Als Referenzproteine dienen: Lysozym, Chymotrypsinogen, Lactat-Dehydrogenase, Katalase und β -Galactosidase. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Aminoacylase trug man die elektrophoretischen Beweglichkeiten gegen den Logarithmus der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine nach [27] auf.

Ebenfalls wurde das Molekulargewicht der Aminoacylase durch Chromatographie an Sephadex G 150 bestimmt [28]. Die Säule (2,5 x 100 cm) wurde mit 20 mM TRIS Puffer pH 7,3 äquilibriert. Der Durchfluß betrug etwa 20 ml/Stunde. Die einzelnen Fraktionen enthielten 50 Tropfen (3,1 ml). Aufgetragen wurde eine Lösung aus Dextranblau, 2 mg Katalase, 3 mg Asparaginase, 3 mg alkalische Phosphatase, 4 mg Aminoacylase, 10 mg Hämoglobin, 3 mg Ovalbumin und 3 mg Carboanhydrase in 5 ml des obigen Tris Puffers. Die Elution der Enzymproteine konnte über deren enzymatische Aktivität bestimmt werden. Ovalbumin war vor dem Auftragen mit Fluoresceinisothiocyanat fluoreszenzmarkiert worden.

2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Normalerweise wurden die Aktivitätsbestimmungen spektrophotometrisch durchgeführt. Bei den Dipeptiden nimmt durch die Spaltung der Amidbindung die Extinktion bei 235 nm ab [29]. Da der Extinktionskoeffizient stark von der Wellenlänge abhängt, wurde er bei jeder Versuchsserie, bei der absolute Werte

bestimmt werden sollten, neu bestimmt. Die Spaltung von N-Chloracetylalanin, das nach GREENSTEIN [8] synthetisiert worden war, läßt sich gut bei 238 nm verfolgen, da bei dieser Wellenlänge die molare Extinktion $\epsilon = 185 \text{ l/Mol} \times \text{cm}$ noch groß genug ist, Proteine aber schon nicht mehr so stark wie bei 235 nm absorbieren. Die Hydrolyse von N-Acetylmethionin wurde nach [30] bei 236 nm gemessen. Kontrollen der photometrischen Ergebnisse und photometrisch schlecht zu messender Verbindungen wie N-Acetylalanin wurden durch jeweilige spezielle Kurzprogramme über den Aminosäureanalysator bestimmt.

2.6. Chemische Modifizierung des Enzyms

2.6.1. Modifizierung der SH-Gruppen

Zur Untersuchung der Hemmwirkung einiger Metallsalze auf die Aminoacylase wurde folgendermaßen verfahren: In 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer pH 8,0 und 40°C wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von N-Chloracetylalanin durch Aminoacylase eine Minute verfolgt. Dann wurde in den laufenden Test 5 μl - 50 μl der entsprechenden Salzlösung zugegeben, kurz gerührt und die Reaktion weitere 5 Minuten verfolgt.

Zur Messung der Inaktivierungsgeschwindigkeit der Aminoacylase durch Reagenzien wie Jodacetamid, 1,3-Dichlorpropanon-2, Chloracetonitril, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid und Vinylpyridin wurde das Enzym über Nacht gegen 0,1 m TRIS Puffer pH 8,0 dialysiert. Anschließend wurden 0,5 ml des Enzyms (2 mg/ml) mit dem Hemmstoff (Endkonzentration 5 mM) bei 25°C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten 20 μl der inkubierten Enzymlösung in vorbereitete Küvetten pipettiert und sofort die Aktivität

bestimmt.

Bei den Disulfidverbindungen (Ellman's Reagenz und CPDS) wurde das Enzym ebenfalls wie vorher über Nacht dialysiert. Dann wurde das Enzym entweder 1 : 1 mit dem Puffer verdünnt, oder es wurde 1 ml eines Hemmstoffes (N-Tosylalanin oder DL-Norleucin) der ebenfalls in dem 0,1 m TRIS Puffer pH 8,0 gelöst war, zugegeben. Die Reaktion wurde bei 25°C mit 100 µl 5 mM Reagenzlösung (Ellman's Reagenz oder CPDS) gestartet und bei 412 nm für Ellman's Reagenz oder 344 nm für CPDS verfolgt [31, 32].

Für die Bestimmung des pK-Wertes der SH-Gruppen mit NEM wurde das Enzym (3 mg/ml) vier Stunden gegen 10 mM TRIS Puffer pH 8,5 dialysiert. Dann wurden 50 µl Aminoacylase mit einem 0,1 m TRIS Puffer des jeweiligen pH-Wertes auf 500 µl verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl wässr. NEM-Lösung (Endkonzentration: $1,5 \times 10^{-4}$ m) bei 0°C gestartet. Nach 0,5 bis 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 10 mM Cysteinlösung und gleichzeitiger Zugabe von 500 µl eiskaltem 0,2 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 abgestoppt und sofort die niedermolekularen Verbindungen auf einer gekühlten Sephadex G 25 medium Säule abgetrennt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration und die Restaktivität bestimmt.

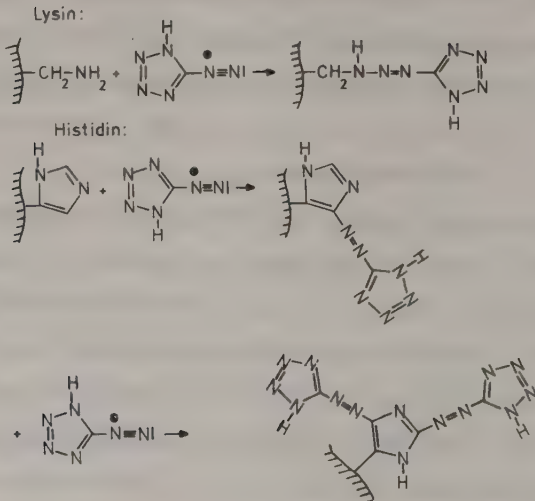
Die Vorbereitung der Proben, die vor der SH-Bestimmung mit TPCK teilweise inaktiviert wurden, geschah auf folgende Weise: Das Enzym (1 mg/ml) wurde über Nacht bei 4°C gegen 0,2 m Carbonatpuffer pH 9,25 dialysiert und anschließend bei 40°C mit 50 µl einer äthanolischen TPCK-Lösung (Endkonzentration 5×10^{-4} m) verschiedene Zeiten inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität bestimmt. Danach wurde die Aminoacylase 5 Stun-

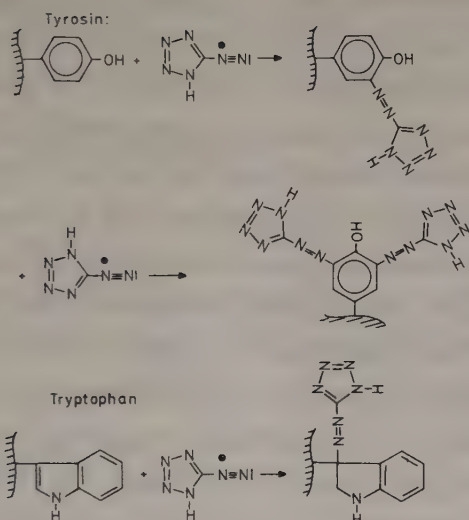
den gegen 0,1 m Boratpuffer pH 8,0 dialysiert und der jeweilige SH-Gehalt gegenüber der Kontrolle mit Ellman's Reagenz bestimmt. Ebenfalls wurden Kontrolle und Proben mit Perameisensäure nach 2.4.2. oxidiert und die Anzahl der SH-Gruppen mit dem Aminosäureanalysator bestimmt.

2.6.2. Reduktion von Disulfidbrücken

Der Einfluß von disulfidreduzierenden Verbindungen auf die Aminoacylase wurde auf folgende Weise bestimmt: Die Aminoacylase wurde bei 40°C in der Küvette 10 Minuten in 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer pH 8,0 mit der entsprechenden Konzentration des Reagenzes inkubiert. Anschließend wurde der Aktivitätstest durch Zugabe von N-Chloracetylalanin gestartet und 2 Minuten die Hydrolyse verfolgt.

2.6.3. Modifizierung mit 5-Diazo-1H-tetrazol





Diazo-1H-tetrazollösungen wurden durch Diazotierung von 5-Aminotetrazol mit Natriumnitrit nach l.c. [33] hergestellt und sofort nach der Herstellung verwendet. Um die letzten Reste des Natriumnitrits zu zerstören, wurde das in einer etwa 0,1 m Lösung hergestellte DHT mit 1 m Harnstofflösung verdünnt. Durch die Umsetzung mit einem ca 100-fachen molaren Überschuß an N^{α} -Acetylhistidin bei pH 8,8 kann man die genaue Konzentration der DHT-Lösung bestimmen [34]. Die Kupplung der Aminoacylase mit der Diazoverbindung erfolgte bei einem 1,5 - 300-fachen molaren Überschuß an DHT im pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 8,5. Als Puffer diente bei pH 5,5 ein 0,1 m Natriumacetatpuffer und bei pH 7,0 und pH 8,5 ein 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer. Das Enzym wurde vor jeder Kupplung mit DHT mindestens 6 Stunden gegen den entsprechenden Puffer dialysiert, da es von der Präparation her in TRIS Puffer gelöst war.

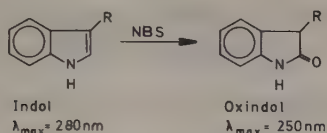
Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur wurde das restliche Reagenz durch Zugabe von 1 m TRIS Puffer pH 7,5 (Triazenbildung mit TRIS) zerstört, die Restaktivität bestimmt und anschließend ausgiebig gegen Wasser dialysiert.

Die Vorbereitung der Proben, die vor der Kupplung mit DHT mit TPCK reagiert hatten, erfolgte auf die folgende Weise: Die Aminoacylase wurde über Nacht bei 4°C gegen einen 0,2 m Carbonatpuffer pH 9,0 dialysiert und anschließend bei 40°C mit 50 µl einer äthanolischen TPCK-Lösung (Endkonzentration 5×10^{-4} m) so lange inkubiert, bis das Enzym noch 3 % bis 5 % Restaktivität hatte. Anschließend wurde das Enzym 6 Stunden gegen Natriumacetatpuffer pH 5,5 dialysiert. Die Kontrolle, die genauso wie die Proben behandelt worden war, wurde mit 50 µl Äthanol anstatt der TPCK-Lösung versetzt. Unter gleichen Bedingungen reagierte dann eine aktive Probe mit einem 2 - 20-fachen molaren Überschuß an DHT bei pH 5,5.

Zur Kontrolle der essentiellen SH-Gruppen dialysierte man das Enzym gegen 0,1 m Acetatpuffer pH 5,5 und ließ es dann mit einem 2 - 24-fachen molaren Überschuß an DHT reagieren. Nach 1,5 Stunden wurde die Reaktion wieder mit 0,1 m TRIS pH 7,5 gestoppt, die Restaktivität bestimmt und die Proben über Nacht gegen 0,2 m Boratpuffer pH 7,5 dialysiert. Die Bestimmung der SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz erfolgte nach 2.6.1.

2.6.4. Oxidation mit N-Bromsuccinimid

NBS reagiert mit Tryptophanresten auf folgende Weise:



Nach der Dialyse der Enzymlösung gegen 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 wurde dieser so viel Harnstoff zugefügt, bis die Lösung 1 m an Harnstoff war. Folgende Konzentrationen fanden bei den Proben, bei denen die Zahl der oxidierten Tryptophanreste mit dem Aminosäureanalysator bestimmt werden sollte, Verwendung: Ein 2 - 200-facher molarer Überschuß an NBS reagierte mit 1 ml Enzymlösung, die 1 mg Enzym/ml enthielt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei Zimmertemperatur wurde die Restaktivität bestimmt und die Proben anschließend für die Aminosäureanalyse dialysiert und hydrolysiert. Die spektroskopische Bestimmung der Zahl der oxidierten Tryptophanreste geschah folgendermaßen: Die dialysierte Enzymlösung (0,5 mg/ml) wurde in der Küvette mit steigenden Mengen einer 10 mM NBS-Lösung versetzt. Nach jeder Reagenzugabe wurde 10 Minuten in der Küvette gerührt und ein UV-Spektrum von 320 bis 230 nm aufgenommen. Die Auswertung der spektroskopischen Daten erfolgte nach l.c. [35].

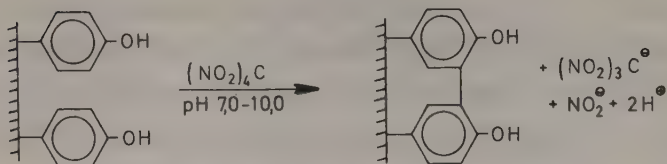
2.6.5. Nitrierung des Enzyms mit Tetranitromethan [36]

Reaktionsschema:

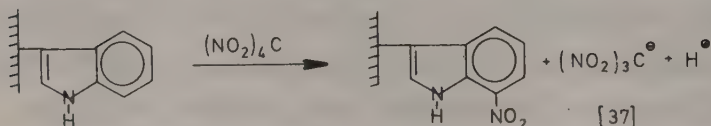
Nitrierung von Tyrosinresten



Vernetzung von Tyrosinresten



Nitrierung von Tryptophanresten



Eine Enzymlösung, die 1 bzw. 2 mg Aminoacylase/ml enthielt, wurde über Nacht bei 4°C gegen einen 0,1 m TRIS Puffer pH 8,0 oder einen 0,1 m Boratpuffer pH 8,0 dialysiert und anschließend mit einem 10 - 300-fachen molaren Überschuß an TNM versetzt (2×10^{-1} m bzw. 2×10^{-2} m Lösung von TNM in abs. Äthanol). Nach 2 Stunden Reaktion bei Zimmertemperatur wurde die Restaktivität bestimmt und die Proben für die Aminosäureanalyse gegen Wasser dialysiert und entsprechend 2.4.2. hydrolysiert.

Proben, bei denen die pH-Abhängigkeit der Reaktion von TNM mit dem Enzym verfolgt werden sollte, wurden vorher gegen 0,1 m TRIS Puffer der entsprechenden pH-Werte zwischen pH 7,0 und pH 9,5 dialysiert und dann mit einem 30 -, 60 - und 150-fachen

molaren Überschuß an TNM versetzt. Nitrotyrosin wird bei der Aminosäureanalyse nach Phenylalanin mit dem 0,2 n Elutionspuffer pH 4,25 abgetrennt. Der c_{HxW} -Wert wurde mit einer Nitrotyrosinlösung bestimmt, die auf die gleiche Weise wie die Enzymproben hydrolysiert wurde. Die Quervernetzung von zwei Tyrosinresten ergab sich aus der Differenz der in der Aminoacylase vorhandenen Tyrosine und der mit dem Aminosäureanalysator bestimmten Anzahl der Tyrosine und Nitrotyrosine.

$$N_{\text{Tyr-Tyr}} = \frac{20 - N_{\text{Tyr}} - N_{\text{Nitrotyr}}}{2}$$

(20 = Zahl der Tyrosinreste im nativen Enzymmolekül).

Die Bestimmung der Anzahl der modifizierten Tryptophanreste erfolgte wie unter 2.4.2. beschrieben.

2.6.6. Acetylierung mit N-Acetylimidazol [38, 39]

0,1 m bzw. 0,01 m N-Acetylimidazolösungen wurden durch Lösen von N-Acetylimidazol in abs. Benzol hergestellt und der gewünschte 15 - 1500-fache molare Überschuß an NAI in ein Reagenzglas pipettiert, sofort sorgfältig mit Argon begast und im Vakuum das Benzol verdampft. Zu diesem festen NAI pipettierte man dann unter kräftigem Schütteln 1 ml Enzymlösung (2 mg/ml) für die optische Bestimmung bzw. für die Aminosäureanalyse 1 ml Enzymlösung (1 mg/ml), die zuvor gegen einen 0,05 m Boratpuffer pH 7,5 dialysiert worden war. Bei der optischen Bestimmung der acetylierten phenolischen OH-Gruppen des Tyrosins wurden nach einer halben Stunde Reaktionszeit bei Zimmertemperatur die Restaktivität bestimmt und anschließend die Proben gegen einen 0,05 m Boratpuffer pH 7,5 dialysiert

und wiederum die Restaktivität der einzelnen Proben gemessen. anschließend reagierten 2 ml der Enzymlösung in der Küvette mit 1 ml einer neutralen 2 m Hydroxylaminlösung. Die Extinktion bei 280 nm wurde vor und 10 Minuten nach der Hydroxylaminzugabe gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz ($\epsilon_{280} = 1160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kann unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Proteinkonzentration die Zahl der modifizierten Reste errechnet werden.

Bei der Bestimmung des Modifizierungsgrades der Tyrosinreste durch NAI mit Hilfe der Aminosäureanalyse wurde das Enzym auf die gleiche Weise wie oben behandelt. Nach der Dialyse reagierte die modifizierte Aminoacylase ebenso wie die Kontrolle mit einem 500-fachen molaren Überschuß an DHT. Da acetylierte Tyrosinreste nicht mehr mit DHT kuppeln, gab die bestimmte Tyrosindifferenz zwischen Kontrolle und dem mit NAI behandelten Enzym die Anzahl der acetylierten Tyrosine an. Auf die gleiche Weise konnte untersucht werden, ob höhere molare NAI-Überschüsse auch Lysinreste acetylierten [39, 40], da die entstandenen N-acetylierten Lysinreste mit DHT keine Triazene mehr bilden können.

2.6.7. Modifizierung der Lysinreste

2.6.7.1. Acetylierung mit Essigsäureanhydrid

Die Enzymlösung (1 mg/ml) wurde 6 Stunden bei 4°C gegen einen 0,2 m Phosphat-Borat-Puffer pH 6,5, pH 7,5 oder pH 8,5 dialysiert und dann mit einem 30 - 8000-fachen molaren Überschuß an ^{14}C -Essigsäureanhydrid versetzt, das mit abs. Methanol verdünnt worden war. Die Enzymlösung reagierte bei Zimmertempera-

tur so lange mit dem Essigsäureanhydrid, bis sich das Anhydrid vollständig zersetzt hatte. Danach wurde ausgiebig 3 mal gegen 5 l Wasser dialysiert bis das Dialysat keine Radioaktivität mehr zeigte. Jeweils 500 μ l der dialysierten Proben wurden mit 15 ml Szintillator-Fertigcocktail Aquasol gemischt und im Szintillationszähler ausgezählt. Nach der Zugabe von 20 μ l eines Toluol- ^{14}C -Standarts zur Ermittlung der Zähl- ausbeute wurden die Proben nochmals ausgezählt. Die Zähl- ausbeute lag bei $82 \pm 3 \%$. Aus der spezifischen Radioaktivität des ^{14}C -Essigsäureanhydrids und der mit Hilfe der Zähl- ausbeute korrigierten Zählraten der Proben und ihrer Protein- konzentration läßt sich der Modifizierungsgrad errechnen.

2.6.7.2. Reaktion mit Trinitrobenzolsulfonsäure

Die Enzymlösung (1 mg/ml) dialysierte über Nacht im Kühlraum gegen einen 0,2 m Carbonatpuffer pH 8,5. 500 μ l des Enzyms wurden auf 40°C temperiert und die Inaktivierungsreaktion durch Zugabe von 100 μ l 0,1 % wässriger TNBS-Lösung gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Inaktivierung durch Zu- gabe von 100 μ l 0,2 m TRIS Puffer pH 8,0 und Abkühlen auf 0°C abgestoppt, sofort die Restaktivität bestimmt und die Enzymlösung gegen einen 0,2 m TRIS Puffer pH 8,5 dialysiert. Der hohe TRIS-Überschuß reagierte schnell mit den restlichen TNBS-Molekülen. Danach wurde durch Zugabe einer wässrigen 0,2 m Natriumdithionitlösung bei 40°C über 50 Minuten das entstandene Trinitroanilinderivat reduziert, die Lösung wie- der dialysiert und hydrolysiert. Mit dem Aminosäureanalysator konnte dann die Anzahl der modifizierten Lysinreste bestimmt

werden. Diese ergab sich aus der Differenz zwischen den in der Aminoacylase vorhandenen 34 Lysinen und der jeweils gefundenen Anzahl von Lysinen.

Die photometrische Bestimmung der modifizierten Lysinreste geschah folgendermaßen: Die Reaktion mit TNBS wurde durch Zugabe von 50 µl konz. Salzsäure und 500 µl 10%iger SDS-Lösung gestoppt. Die SDS-Lösung war notwendig, um nach der Salzsäurezugabe das Enzymprotein in Lösung zu halten. Danach wurde die Extinktion bei 345 nm gemessen. Unter Berücksichtigung der Proteinverdünnung kann man nach HABEEB [41] die Anzahl der modifizierten Lysinreste bestimmen.

2.6.7.3. Reaktion des Enzyms mit Chlormethylketonen

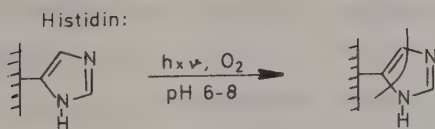
Proben, bei denen der durch Reaktion von TPCK und TLCK mit dem Enzym entstandene Lysinverlust mit dem Aminosäureanalysator bestimmt werden sollte, wurden folgendermaßen behandelt: 0,5 mg Enzym wurden gegen einen 0,2 m Carbonatpuffer pH 9,0 dialysiert. Die Aminoacylase reagierte dann bei 40°C mit dem in abs. Äthanol gelösten TPCK oder TLCK. Die Endkonzentration der Chlormethylketone betrug 2×10^{-4} Mol/l. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 0°C gestoppt, sofort die Restaktivität bestimmt und die Proben durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumborhydrid reduziert. Das bei der Reaktion von TPCK mit der ε-Aminogruppe des Lysins entstandene Keton zerfällt bei der sauren Hydrolyse und es entsteht zum Teil wieder Lysin. Daher mußte vor der Hydrolyse das Keton mit Natriumborhydrid reduziert werden. Nach der Reduktion wurde das Enzym dialysiert und hydrolysiert.

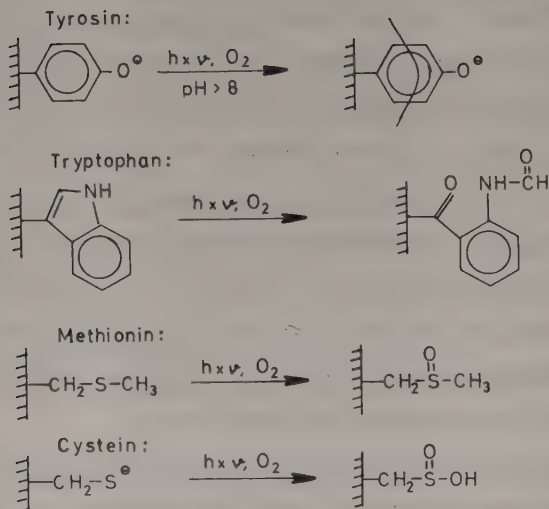
Proben, bei denen der pK-Wert der reagierenden Lysingruppe bestimmt werden sollte, wurden auf folgende Weise behandelt: Die Aminoacylase (2 mg/ml) wurde in 10 mM Carbonatpuffer pH 9,0 gelöst. Bei 40°C wurden 50 µl Enzym mit 500 µl 0,2 m Carbonatpuffer pH 8,0 bis pH 10,25 inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl äthanolischer TPCK-Lösung (Endkonzentration: 2×10^{-4} m) gestartet. Der Kontrollwert enthielt 20 µl Äthanol. Nach verschiedenen Zeiten entnahm man 20 µl Enzymlösung und pipettierte sie sofort in den vorbereiteten Aktivitätstest. Da der Aktivitätstest bei pH 8,0 stattfindet und die zugegebene Enzymlösung 1 : 50 verdünnt wird, wird damit die Inaktivierungsreaktion abgestoppt.

In Versuchen, bei denen der Einfluß von kompetitiven Inhibitoren auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung der Aminoacylase durch TPCK ermittelt werden sollte, wurde die in 0,2 m Carbonatpuffer pH 9,25 befindliche Enzymlösung ($0,5 \times 10^{-5}$ m) mit der entsprechenden Konzentration an Hemmstoff bei 40°C vorinkubiert. Dann wurden Kontrolle und Proben wie oben beschrieben mit TPCK ($1,5 \times 10^{-4}$ m) 10 Minuten inkubiert und die Restaktivität bestimmt.

2.6.8. Photooxidation mit Methylenblau [42, 43, 44, 45]

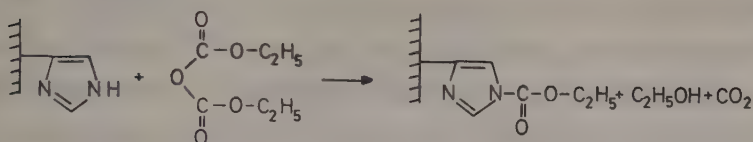
Photooxidation von Proteinen in Gegenwart von Methylenblau erfaßt folgende Reste:





Als Lichtquelle bei der Photooxidation diene eine Lampe, die auch für die Photopolymerisation von Polyacrylamidgelen verwendet wird. Über dieser Lampe war in einem Abstand von 8 cm eine klare Kunststoffplatte befestigt. Auf dieser Platte standen die Proben, die sich in 5 ml Glasfläschchen befanden. Bei der Belichtung wurde die photochemische Reaktion des Enzyms, das jeweils gegen den gewünschten 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer zwischen pH 6,0 und pH 8,0 dialysiert worden war, mit einer wässrigen Lösung von Metylenblau in einer Endkonzentration von 0,025 % gestartet. Nach der gewünschten Belichtungszeit wurde sofort die Restaktivität bestimmt und das Enzym anschließend im Dunkeln dialysiert.

2.6.9. Modifizierung der Histidinreste mit Diäthylpyrocarbonat [46, 47, 48]



Die Aminoacylase wurde gegen 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 dialysiert und dann mit diesem Puffer soweit verdünnt, daß das Enzym eine Konzentration von ca. 0,5 mg/ml hatte. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von DEP (0,8 bis 32 mM) in abs.Äthanol zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur wurde die Restaktivität bestimmt und Differenzspektren gegen die Kontrolle von 320 nm bis 230 nm aufgenommen. Einige so inaktivierte Proben wurden über Nacht gegen 0,1 m TRIS Puffer pH 8,0, der 0,1 m an Hydroxylamin war, bei 4°C dialysiert. Danach wurde wieder die Restaktivität der Proben und ihr Modifizierungsgrad bestimmt.

2.7. Einfluß von Komplexbildner auf die Enzymaktivität

Um die Aminoacylase von Metall zu befreien, wurde das Enzym ca. 40 Stunden bei 4°C gegen einen 0,1 m TRIS - bzw. 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer pH 8,0, der 1 mM an Phenanthrolin oder 10 mM an EDTA war, dialysiert. Die Kontrolle wurde gegen die gleichen Puffer, die jedoch keine Komplexbildner enthielten, dialysiert.

Zur Bestimmung der Hitzestabilität wurden jeweils 2 ml Enzym (3 mg/ml) 40 Stunden gegen einen 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer

pH 8,0 dialysiert, der 1 mM an Phenanthrolin war; die Kontrolle enthielt kein Phenanthrolin. Anschließend dialysierten beide Proben nochmals 4 Stunden gegen die obigen Puffer, deren Konzentration jedoch nur 1 mM war. Bei 50°C wurden 250 µl der entsprechenden 0,1 m Puffer im pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 9,6 (pH 4,0 und pH 5,0 Succinat-Borat-Puffer, pH 6,0 bis pH 8,8 Phosphat-Borat-Puffer und pH 9,6 Carbonatpuffer) inkubiert und dann 50 µl des dialysierten Enzyms zugegeben. Die Aktivität wurde sofort nach der Zugabe des Enzyms nach 5 Minuten und nach 10 Minuten bestimmt. Eine Serie enthielt zusätzlich Zinkchlorid (Endkonzentration: 0,1 mM).

Die Reaktion von Ellman's Reagenz mit den SH-Gruppen der Aminoacylase mit und ohne Metallionen geschah auf die gleiche Weise, die bereits bei der Untersuchung der SH-Gruppen in 2.6.1.2. beschrieben wurde. Hier wurde nur eine Probe wieder 40 Stunden gegen den 0,1 m TRIS Puffer dialysiert, der zusätzlich 1 mM Phenanthrolin enthielt.

Die Histidinmodifizierung wurde wie in 2.6.9. beschrieben durchgeführt. Auch hier wurde eine Probe 40 Stunden gegen einen 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer pH 8,0 dialysiert, der 1 mM an Phenanthrolin war, während die Kontrolle kein Phenanthrolin enthielt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Reinigung

Ausgangsmaterial für die Reinigung war ein Rohenzym von Aminoacylase aus Schweineniere, das eine spezifische Aktivität von 34 U hatte. Ein einheitliches Enzym wurde von diesem Rohenzym durch Gelfiltration an Sephadex G 150 und DEAE-Cellulose-Chromatographie erhalten. Die Elutionsdiagramme der Sephadex G 150 Säule und der DEAE-Cellulose Säule zeigen Abbildung 1 und Abbildung 2.

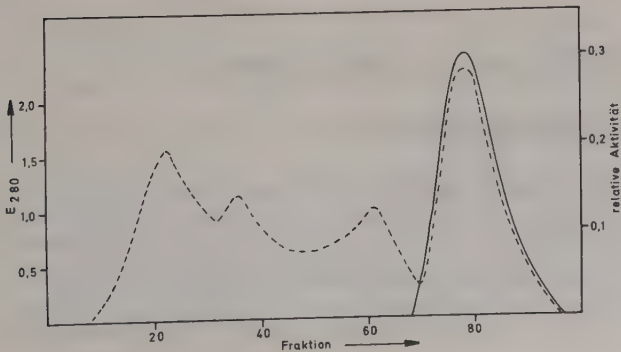
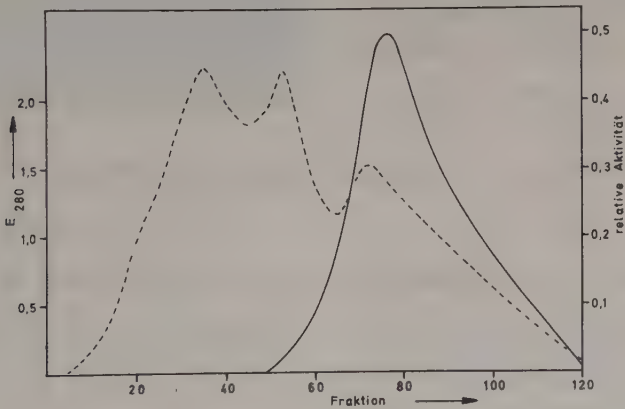


Abb. 1 Elutionsdiagramm des Rohenzym an der Sephadex G 150 Säule.

Abb. 2 Elutionsdiagramm der aktiven Fraktion von der Sephadex G 150 Säule an DEAE-Cellulose.

- - - Absorption bei 280 nm; — relative Aktivität.

Die folgende Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Reinigung. Danach ist es möglich mit der beschriebenen Methode in einer Ausbeute von 40 % und einer 7,3 fachen Anreicherung reine Aminoacylase zu erhalten.

Tab. 1 Reinigung der Aminoacylase aus Schweineniere

Schritt	Protein [mg]	Gesamt-akt. [U]	spezifische Aktivität[U]	Anreicher-ung	Ausbeute %
Rohenzym	2000	70000	34	-	100
Sephadex G 150	550	38500	68	2	55
DEAE-Cellulose	112	28000	250	7,3	40

Die Proteinkonzentration nach der DEAE-Cellulose Säule betrug zwischen 1 bis 3 mg/ml. Die aktiven Proben wurden gesammelt und portionsweise eingefroren.

3.2. Proteinchemische Untersuchungen

3.2.1. Reinheitskontrolle

Wird die gereinigte Aminoacylase auf eine analytische Disk-elektrophorese gegeben, so erhält man nur eine Bande. Wie Abbildung 3 zeigt, ist diese Bande jedoch nicht scharf sondern relativ breit. Bei der SDS-Elektrophorese findet man bei Pro-

ben, die mit Perameisensäure oxidiert worden sind, nur eine einzige scharfe Bande, die dem Molekulargewicht der Untereinheit entspricht und eine schwache Bande, die dem Molekulargewicht des kompletten Enzyms entspricht. Um zusätzlich zu bestätigen, daß die Aminoacylase einheitlich ist, wurde eine Immunelektrophorese durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4. Auch hier entsteht nur ein scharfer Bogen.



Abb. 3 Diskelektrophorese von gereinigter Aminoacylase. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

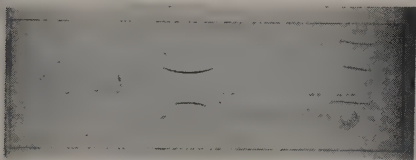


Abb. 4 Immunelektrophorese der gereinigten Aminoacylase.

3.2.2. Molekulargewichtsbestimmung

a). Sephadex G 150 [28]

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des Sephadex G 150 Laufs. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht für die aktive Aminoacylase von 86000 ± 3000 . Bei der Abbildung muß man berücksichtigen, daß Katalase in der Regel etwas oberhalb der Kurve liegt.

b). SDS-Elektrophorese

Das Molekulargewicht der Aminoacylase wurde außerdem durch SDS-Elektrophorese bestimmt. Trägt man hier die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine gegen den Logarithmus der Molekulargewichte der Polypeptidketten auf, so erhält man Abb.6. Die relative Beweglichkeit der Hauptbande der Aminoacylase erscheint bei einem Molekulargewicht von ca. 43000.

Trägt man Aminoacylase auf, deren Disulfidbrücken vorher nicht durch Perameisensäure oder Mercaptoäthanol gespalten wurden, so zerfällt auch diese Probe in der SDS-Elektrophorese fast ausschließlich in eine Bande, mit dem Molekulargewicht von 43000. Der Molekularpeak der Aminoacylase mit einem Molekulargewicht von 86000 erscheint nur schwach (5 - 10 % der aufgetragenen Aminoacylase). Die Ergebnisse beider Bestimmungsmethoden stimmen also gut überein.

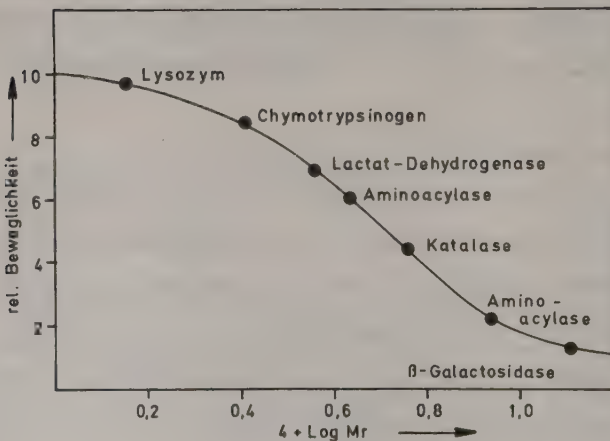
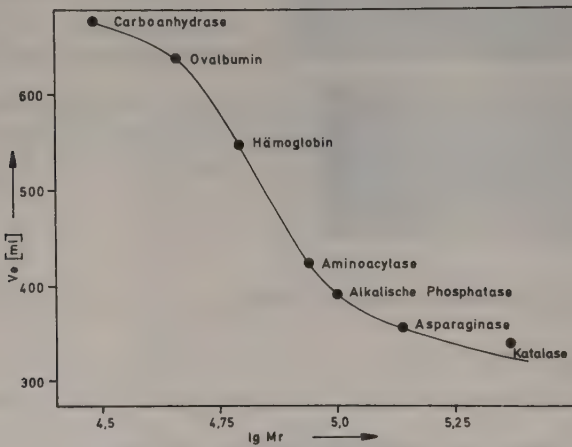


Abb. 5 Bestimmung des Molekulargewichts der aktiven Aminoacylase durch Gelfiltration an Sephadex G 150. Aufgetragen wurde das Elutionsvolumen gegen den Logarithmus der Molekulargewichte.

Abb. 6 Bestimmung des Molekulargewichtes der Aminoacylase und ihrer Untereinheiten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die Molekulargewichte der Referenzproteine wurde von [27] übernommen.

Die SDS-Elektrophorese zeigt weiter, daß die Aminoacylase aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Da das Enzym auch ohne disulfidspaltende Reagenzien bei der SDS-Elektrophorese zerfällt, sind beide Untereinheiten nicht kovalent über Disulfidbrücken miteinander verknüpft.

3.2.3. Aminosäureanalyse

Tabelle 2 zeigt die Aminosäurezusammensetzung der Aminoacylase. Das Enzym enthält demnach 772 Aminosäuren, von denen 98 zur Gruppe der basischen und 72 zu den aromatischen Aminosäuren gehören. Außerdem enthält die Aminoacylase 152 saure Aminosäuren. Dieses paßt gut zu dem nach [49] bestimmten isoelektrischen Punkt von etwa pH 5,0. Mindestens 272 Aminosäuren (etwa 32 %) sind hydrophob. Summiert man das Molgewicht der einzelnen in der Aminoacylase vorhandenen Aminosäuren, so erhält man ein Molekulargewicht von etwa 85500.

Tab. 2 Aminosäurezusammensetzung der Aminoacylase
(Durchschnittswerte aus 4 Bestimmungen)

Aminosäure	Anzahl der Reste pro Mol	Bester geradzahlicher Wert	Molprozent
Ala	68,6 $\pm$ 0,6	68	8,79
Arg	39,4 $\pm$ 0,8	40	5,17
Asp	60,3 $\pm$ 0,4	60	7,75
Cys	12,1 $\pm$ 0,6	12	1,55
Glu	91,4 $\pm$ 1,2	92	11,89
Gly	59,4 $\pm$ 1,1	60	7,75
His	24,3 $\pm$ 0,4	24	3,10
Ile	22,4 $\pm$ 1,4	22	2,84
Leu	68,5 $\pm$ 0,9	68	8,79
Lys	34,6 $\pm$ 0,8	34	4,39
Met	16,6 $\pm$ 0,9	16	2,07
Phe	39,6 $\pm$ 0,7	40	5,17
Pro	51,7 $\pm$ 1,6	52	6,72
Ser	46,4 $\pm$ 1,4	46	5,94
Thr	43,3 $\pm$ 1,6	44	5,68
Trp	11,9 $\pm$ 0,7	12	1,55
Tyr	19,5 $\pm$ 0,6	20	2,58
Val	62,0 $\pm$ 1,0	62	8,01

3.2.4. SH-Bestimmung

Mit Ellman's Reagenz können pro Aminoacylasemolekül 4 SH-Gruppen erfaßt werden. Bei der Aminosäureanalyse mit Perameisensäure wurden 12 Cysteinsäurereste gefunden. Inkubiert man

das Enzym mit Vinylpyridin, so reagieren 4 SH-Gruppen mit diesem Reagenz. Auch nach Zusatz von 8 m Harnstoff wurden mit Vinylpyridin keine weiteren SH-Gruppen erfaßt. Wird die Aminoacylase jedoch vorher mit DTE inkubiert, so reagieren 8 SH-Gruppen mit Vinylpyridin unter Bildung von S- β [4-pyridyläthyl]cystein; das bedeutet, daß 2 Disulfidbrücken durch DTE reduziert wurden. Die restlichen beiden Cystine werden nur bei der Perameisensäureoxidation erfaßt. Tabelle 3 faßt diese Ergebnisse zusammen.

Tab. 3 Anzahl der Cystin- und Cysteinreste der Aminoacylase
(Mittelwerte aus drei Bestimmungen)

Bedingungen	Anzahl der Cystein- säuren	Anzahl der S- β [pyridyl äthyl]cys.	Anzahl der Cysteine	Anzahl der Cystine	Anzahl der Cys/2
Aminoacylase	12,1	-	-	-	12
Aminoacylase + VP	8,3	4,2	4	4	12
Aminoacylase + 8m Harnst.+ VP	7,5	4,2	4	4	12
Aminoacylase + 8 m Harnst.	4,3	7,5	8	2	12
+ DTE + VP					

3.3. Funktion und Reaktivität der SH-Gruppen

Verhalten gegen Schwermetalle

Da bei der Aminosäurebestimmung der Aminoacylase gefunden wurde, daß das Enzym pro Untereinheit 2 SH-Gruppen enthält,

wurde untersucht, welche Funktion diese beiden SH-Gruppen für die Aktivität des Enzyms besitzen. Inkubiert man das Enzym mit Schwermetallsalzen, so inaktivieren diese das Enzym. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.

Tab. 4 Hemmwirkung verschiedener Metallsalze auf die Aminoacylaseaktivität.

Konzentration in der Küvette	% Restaktivität				
	Hg ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Co ²⁺	Mg ²⁺
1 x 10 ⁻⁵ M	5 %	80 %	95 %	100 %	100 %
1 x 10 ⁻⁴ M	0 %	54 %	86 %	98 %	100 %
5 x 10 ⁻⁴ M	0 %	45 %	46 %	75 %	100 %
1 x 10 ⁻³ M	0 %	5 %	5 %	58 %	100 %

Quecksilber-II-Salze inaktivieren schon in einer Konzentration von 1 x 10⁻⁴ M das Enzym vollständig. Cadmium-, Zink- und Kobaltsalze zeigen einen etwas schwächeren Effekt.

Reaktion mit SH-Reagenzien

Über die Reaktivität der SH-Gruppen der Aminoacylase mit verschiedenen SH-Reagenzien gibt Tabelle 5 Aufschluß. Sie zeigt, daß die Aminoacylase schnell durch Disulfidverbindungen wie Ellman's Reagenz oder CPDS inaktiviert wird. Ebenso reagieren die SH-Gruppen sehr schnell mit N-Äthylmaleinimid und auch mit dem weniger reaktiven Vinylpyridin. Unerwartet ist jedoch, daß so reaktive SH-Reagenzien wie Jodacetamid nur sehr langsam das Enzym inaktivieren. Ebenso verhalten sich die andern über Carbonylfunktionen oder über andere Gruppen mit starkem - I-Effekt aktivierten Halogenverbindungen. Sie alle reagieren

nur sehr langsam mit den SH-Gruppen der Aminoacylase.

Tab. 5 Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion von SH-Reagenzien mit Aminoacylase in 0,1 m TRIS Puffer pH 8,0 bei 25°C

SH-Reagenz	k_2 [l x Mol ⁻¹ x sec ⁻¹]
Jodacetamid	$6,26 \times 10^{-2}$
1,3-Dichlorpropanon-2	$1,33 \times 10^{-2}$
Chloracetonitril	$0,53 \times 10^{-2}$
2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid	$1,00 \times 10^{-2}$
Ellman's Reagenz	3,60
CPDS	2,07
Vinylpyridin	$3,67 \times 10^{-2}$
NEM	39,50 (bei 0°C)

$k_2 = k_1/c$ k_1 = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung
für die Inaktivierung
c = Konzentration des jeweiligen SH-Reagenzes.

Die SH-Bestimmung der Aminoacylase hatte ergeben, daß 4 Cysteine vorhanden sind, also zwei SH-Gruppen pro Untereinheit. Es wurde daher untersucht, welche SH-Gruppen für die Katalyse essentiell sind. Inkubiert man das Enzym unterschiedlich lange mit NEM, so zeigt sich, daß nach Reaktion von 2 SH-Gruppen das Enzym inaktiv ist (siehe Abb.4). Diese beiden SH-Gruppen, die für die Katalyse essentiell sind, reagieren schneller mit NEM als die beiden restlichen SH-Gruppen.

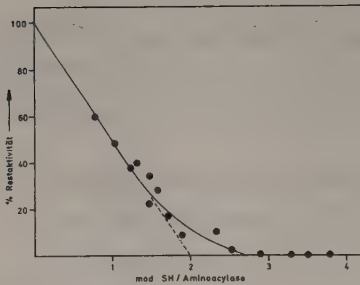


Abb. 7 Verhältnis von Restaktivität und Modifizierungsgrad der SH-Gruppen der Aminoacylase mit NEM. Reaktionsbedingungen: 0,1 m TRIS-Puffer pH 8,0. Bestimmung des SH-Gehalts mit Ellman's Reagenz.

Bestimmt man die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion der SH-Gruppen mit NEM so findet man, daß die für die Katalyse essentiellen SH-Gruppen ungefähr 8 mal schneller reagieren als die beiden nicht essentiellen. Das gleiche Bild beobachtet man bei der Reaktion mit den Disulfidverbindungen. Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Kurve $\ln C/C_0$ gegen die Zeit bei der Reaktion von Ellman's Reagenz mit Aminoacylase. Sind die beiden ersten SH-Gruppen fast vollständig modifiziert, so knickt die Gerade ab und geht nach kurzer Übergangszeit in eine zweite Gerade über, die der Reaktionsgeschwindigkeit der beiden anderen SH-Gruppen entspricht.

Versucht man die Modifizierungsgeschwindigkeit der SH-Gruppen durch kompetitive Inhibitoren zu beeinflussen, so ergibt sich folgendes Bild: N-Tosylalanin hemmt die Erfassung aller 4 SH-Gruppen in etwa gleich gut. Ebenso erschwert Norleucin die Reaktion der SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz.

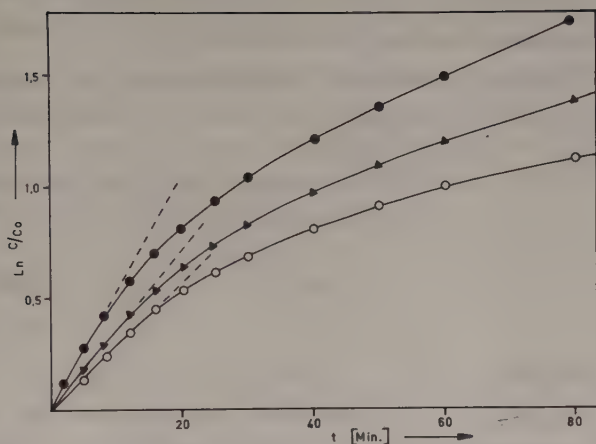


Abb. 8 Einfluß von kompetitiven Inhibitoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Aminoacylase mit Ellman's Reagenz. Reaktionsbedingungen: 0.1 m TRIS-Puffer pH 8,0. Enzym: 1 mg/ml Ellman's Reagenz: $2,5 \times 10^{-4}$ m 25°C. ●—● ungehemmt, ▼—▼ 25 mM N-Tosylalanin, ○—○ 10 mM DL-Norleucin.

In Tabelle 6 sind die Geschwindigkeitskonstanten zusammengefaßt, die sich bei der Inaktivierung der Aminoacylase durch NEM, CPDS oder Ellman's Reagenz ergeben. Man sieht auch hier, daß sich die essentiellen SH-Gruppen und die nichtessentiellen deutlich in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit mit den SH-Reagenzien unterscheiden. Ebenso wird noch einmal demonstriert, daß die kompetitiven Inhibitoren (N-Tosylalanin und Norleucin) die beiden in der Reaktivität unterschiedlichen SH-Gruppen vor dem Angriff der SH-Reagenzien schützen.

Tab. 6 Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion verschiedener SH-Reagenzien mit den SH-Gruppen der Aminoacylase in 0,1 m TRIS-Puffer pH 8,0 bei 25°C

Reagenz	k_2 [$l \cdot Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$] für die schnell reagierenden SH-Gruppen	k_2 [$l \cdot Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$] für die langsam reagierenden SH-Gruppen
NEM	6,67*	0,80 *
CPDS	2,07	0,61
Ellman's Reagenz	3,60	0,76
Ellman's Reagenz + 25 mM N-Tosylala.	2,52	0,55
Ellman's Reagenz + 10 mM DL-Norleucin	1,98	0,38

* bei pH 7,0 und 0°C

Den gegenteiligen Effekt wie die kompetitiven Hemmstoffe zeigt Harnstoff. In Gegenwart von Harnstoff steigt die Geschwindigkeit der Inaktivierung der Aminoacylase vor allem durch aktivierte Halogenverbindungen.

Inaktiviert man die Aminoacylase durch den kovalent gebundenen Inhibitor TPCK, so kann man nach der Dialyse mit Ellman's Reagenz keine SH-Gruppen mehr erfassen. Trägt man die Restaktivität nach der TPCK-Behandlung gegen den mit Ellman's Reagenz bestimmten Rest-SH-Gehalt des Enzyms auf, so erhält man die in Abbildung 9 gezeigte Gerade. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei dem Enzymmolekül, das mit TPCK reagiert hat, mit Ellman's Reagenz keine der beiden SH-Gruppen mehr erfaßbar ist.

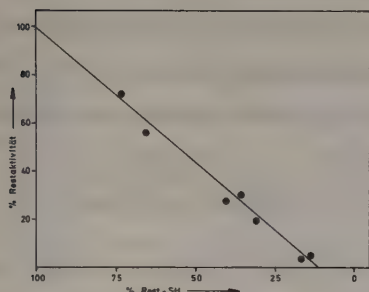


Abb. 9 Beziehung zwischen Restaktivität und Rest-SH-Gehalt nach verschiedenen starker Inaktivierung der Aminoacylase durch TPCK. Bestimmung des SH-Gehalts mit Ellman's Reagenz.

pK-Werte der essentiellen SH-Gruppen

Als nächstes war von Interesse, welchen pK-Wert die für die Katalyse essentielle SH-Gruppe hat. Dieser wurde über die pH-Abhängigkeit der Inaktivierung mit NEM bestimmt.

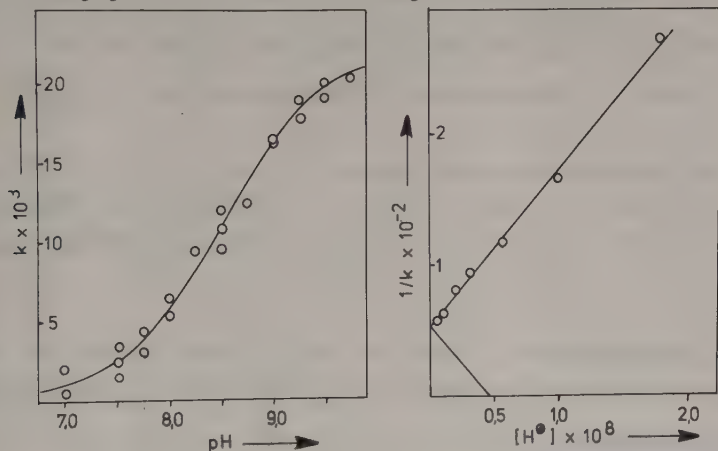


Abb. 10 pH-Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit der Aminoacylase durch NEM.

Abb. 11 Auftragung der Mittelwerte aus Abb. 10 nach Lindley [50].

Die Geschwindigkeit der Reaktion von NEM mit Aminoacylase wurde im pH-Bereich von pH 7,0 bis pH 9,5 untersucht. Dabei

wurde der Überschuß an NEM so gewählt, daß die Reaktion noch nach erster Ordnung verlief. Trägt man die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung gegen den pH-Wert auf, so erhält man die in Abbildung 10 dargestellte Kurve. Trägt man diese Werte in ein Lindley-Diagramm [50, 51] ein, so sieht man, daß sich die Meßpunkte gut durch eine Gerade verbinden lassen. Es ergibt sich daraus ein pK-Wert von $pK = 8,35$ für die katalytisch essentiellen SH-Gruppen.

Vergleich der Reaktivität verschiedener SH-Enzyme und niedermolekularer SH-Verbindungen mit NEM.

Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion der SH-Gruppen der Aminoacylase und anderer SH-Verbindungen mit NEM, so ergibt sich Tabelle 7.

Tab. 7 Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion von SH-Verbindungen und SH-Enzymen mit NEM bei pH 7,0.

Verbindung	$k_2 \times 10^{-3}$ [l · Mol ⁻¹ · sec ⁻¹]	Temperatur [°C]	Rel. Reaktivität	Lit.
Cystein	1,53	25	115	53
N-Acetylcysteinamid	1,33	25	100	52
Glutathion	1,18	25	88	52
4-Mercaptomethylimidazol	9,45	25	710	52
Fiçin	$6,50 \times 10^{-7}$	25 *		54
Papain	$1,85 \times 10^{-3}$	30		55
Aminoacylase	$6,67 \times 10^{-3}$	0		
* pH 6,68	$0,80 \times 10^{-3}$	0		

Niedermolekulare SH-Verbindungen reagieren erheblich schneller mit NEM als die SH-Gruppen der Aminoacylase. Vergleicht man jedoch andere SH-Enzyme, so zeigt sich, daß Papain beträchtlich langsamer reagiert.

Einfluß von SH-Verbindungen auf die Aktivität der Aminoacylase.

Betrachtet man den Einfluß von disulfidreduzierenden Verbindungen auf die enzymatische Aktivität der Aminoacylase, so erhält man Tabelle 8.

Tab. 8 Einfluß von SH-Verbindungen auf die Aktivität der Aminoacylase.

Konzentration in der Küvette [M]	% Restaktivität			
	NaHS	Cystein	Mercaptoäthanol	DTE
5×10^{-5}	98	90	60	44
1×10^{-4}	94	80	46	25
5×10^{-4}	90	60	28	5
1×10^{-3}	75	30	16	0
5×10^{-3}	25	12	0	0

Alle Reagenzien inaktivieren das Enzym; am schwächsten Natriumhydrogensulfid und am stärksten DTE. In dieser Reihenfolge nehmen auch die Redoxpotentiale der Verbindungen ab. Dieser Versuch steht im vollem Einklang mit der SH-Bestimmung mit dem Aminosäureanalysator. Auch dort wurden durch Zugabe von DTE zwei weitere SH-Gruppen pro Untereinheit gefunden. Diese Disulfidbrücke ist also relativ leicht zugänglich und essentiell für die aktive Konformation des Enzyms. Inkubiert

man das Enzym nur kurze Zeit mit DTE, so kann man die Aktivität durch Abtrennen des DTE über eine 25 cm lange Sephadex G 25 Säule zum Teil wieder erhalten. Bei längerer Inkubationszeit verliert das Enzym völlig seine Aktivität.

3.4. Vergleichende kinetische Untersuchungen mit N-Acyl-aminosäuren und Dipeptiden als Substrate.

Die Aminoacylase spaltet, wie ihr Name sagt, N-Acylamino-säuren. Da in der Literatur schon weitgehend der Einfluß der Acylkomponente und auch der Einfluß der Aminosäure auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse und auf die K_m -Werte untersucht worden ist [8, 13], wurde nur N-Chloracetylalanin und N-Acetylmethionin als N-Acylamino-säuren mit Dipeptidsubstraten verglichen. Wie Tabelle 12 zeigt, ist N-Chloracetylalanin ein gutes Substrat für die Aminoacylase. Ebenfalls zeigt die Amidgruppe um 235 nm eine recht hohe Absorption. Im Gegensatz zu N-Acetylalanin absorbiert N-Chloracetylalanin auch noch bei etwas höheren Wellenlängen (Abb. 12). Die Spaltung durch Aminoacylase wurde daher bei 238 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge beträgt der Extinktionskoeffizient $\epsilon = 185$ [$l \times \text{Mol}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$].

Abbildung 13 zeigt, daß das pH-Optimum der Aminoacylase für N-Chloracetylalanin bei pH 8,0 liegt. Bestimmt man die app. K_m -Werte für N-Chloracetylalanin zwischen pH 6,5 und pH 9,4, also in dem gesamten pH-Bereich in dem die Aminoacylase aktiv ist, so zeigt sich, daß der app. K_m -Wert für alle pH-Werte gleich ist.

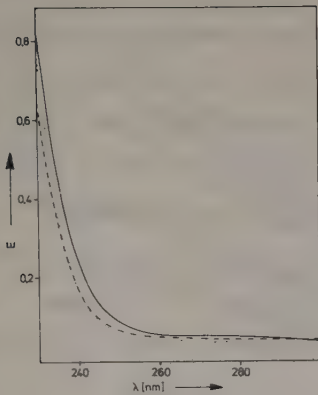
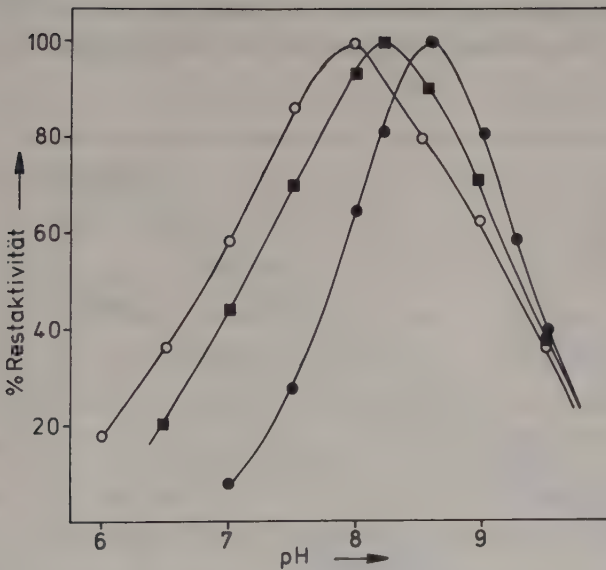


Abb. 12 Absorptionsspektren von: N-Acetylalanin (20 mM), — N-Chloracetylalanin (2 mM) und --- N-Acetylmethionin (2,5 mM).

Abb. 13 pH-Abhängigkeit der Aktivität der Aminoacylase für verschiedene Substrate:

○—○ N-Chloracetylalanin
●—● Glycylalanin
■—■ deprotoniertes Glycylalanin.



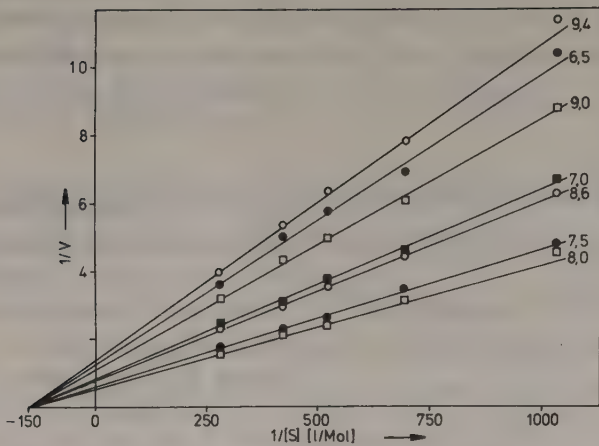


Abb. 14 Lineweaver-Burk-Diagramm der Spaltung von N-Chlor-acetylalanin durch Aminoacylase bei pH-Werten von pH 6,5 bis pH 9,4. Die einzelnen pH-Werte sind im Diagramm angegeben.

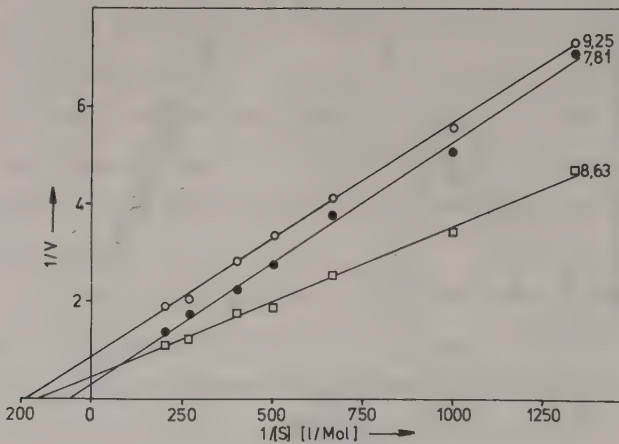


Abb. 15 Lineweaver-Burk-Diagramm der Spaltung von Glycyl-leucin durch Aminoacylase bei verschiedenen pH-Werten:

●—● pH 7,8; □—□ pH 8,6; ○—○ pH 9,2.

Der Vergleich von Dipeptiden mit N-Chloracetylalanin zeigt, daß die Aminoacylase auch recht gut Dipeptide umsetzt. Allerdings liegt das pH-Optimum bei der Spaltung der Dipeptide bei pH 8,6. Wie Abbildung 13 zeigt, fällt die Kurve zum basischen Bereich hin relativ schnell ab und trifft sich bei pH 9,5 mit der Kurve von N-Chloracetylalanin. Aber auch im sauren Bereich fällt die Aktivität rasch ab und bei pH 7,0 setzt die Aminoacylase schon fast keine Dipeptide mehr um. Werden die app. K_m -Werte für Dipeptide ebenfalls bei verschiedenen pH-Werten bestimmt, so ergibt sich ein umso kleinerer app. K_m -Wert, je basischer der pH-Wert wird (Abb. 15).

Ein ähnliches Bild ergibt die Hemmwirkung von Aminosäuren auf die Katalyse der Aminoacylase. Wie Abbildung 16 zeigt, hemmt die gleiche Konzentration an L-Leucin die Hydrolyse von N-Chloracetylalanin bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich stark. Bei niedrigen pH-Werten gering, bei hohen pH-Werten stark. Die Ergebnisse zeigen, daß Aminosäuren und Dipeptide bei höheren pH-Werten von der Aminoacylase besser gebunden werden. Wird nun die bei dem jeweiligen pH-Wert vorliegende Konzentration an deprotonierter Aminosäure mit Hilfe der Henderson-Hasselbachschen-Gleichung berechnet, so zeigen sich folgende Ergebnisse. Die pH-Abhängigkeit der Spaltung der Dipeptide läuft parallel zur N-Chloracetylalaninspaltung und ist ganz leicht zum Basischen hin verschoben. Das pH-Optimum für Dipeptide liegt bei pH 8,2 (Abb. 12). Ebenso werden die app. K_m -Werte für Dipeptide völlig analog zu N-Chloracetylalanin unabhängig vom pH-Wert. Berechnet man in Abbildung 16 wiederum die Konzentration an deprotoniertem

Leucin, so erhält man Abbildung 17. Auch hier liegen alle Punkte auf einer Geraden.

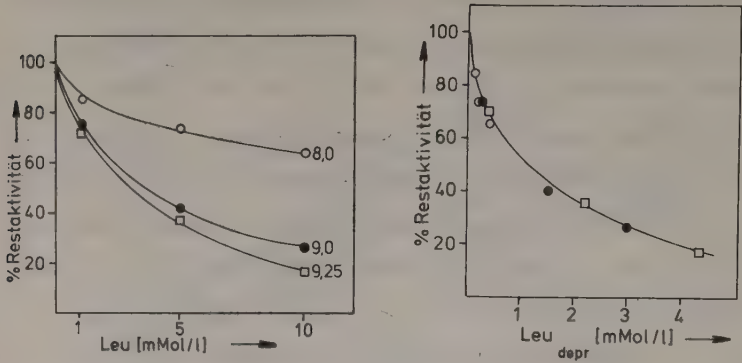


Abb. 16 pH-Abhängigkeit der Hemmung der Aminoacylase durch Leucin. Substrat: N-Chloracetylalanin.

○—○ pH 8,0; ●—● pH 9,0; □—□ pH 9,2.

Abb. 17 pH-unabhängige Hemmung der Aminoacylase durch Leucin. Aufgetragen wurde die jeweilige Konzentration an deprotoniertem Leucin aus Abbildung 16.

Die folgende Tabelle 9 bekräftigt noch einmal, daß viele Dipeptide recht gute Substrate für die Aminoacylase sind.

Tab. 9 K_m - und V_{max} -Werte für die Umsetzung von Dipeptiden und N-Acylaminosäuren durch Aminoacylase.

Dipeptide/ N-Acylaminosäuren	$10^3 \times K_m$ [Mol/l]	$10^3 \times K_m$ [Mol/l] pH-unabhängig	V_{max} [U]
Gly-Gly	7,1	5,8	4,5
Gly-Ala	6,6	4,9	27,7
Gly-Ser	6,6	5,0	21,7
Gly-Leu	6,6	5,1	55,5
Ala-Leu	5,0	4,0	62,5

Dipeptide/ N-Acylaminosäuren	$10^3 \times K_m$ [Mol/l]	$10^3 \times K_m$ [Mol/l] pH-unabhängig	V_{max} [U]
Leu-Leu	0,25	0,20	2,4
Leu-Ala	1,8	1,5	2,0
Thr-Ala	15,0	14,2	7,1
Cl-CH ₂ -CO-Ala	6,6	6,6	250,0
CH ₃ -CO-Met	5,2	5,2	420,0

Meßwerte zur Tabelle: K_m app. wurde bei pH 8,6 bestimmt. Die pH-unabhängigen K_m -Werte wurden nach der Henderson-Hasselbachschen-Gleichung berechnet. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten V_{max} der Dipeptide durch Aminoacylase wurden ebenfalls bei pH 8,6 bestimmt. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für N-Acylaminosäuren wurden bei pH 8,0 bestimmt.

Wie schon am Beispiel von Leucin gezeigt wurde, hemmen nicht nur die Acylkomponenten der Substrate wie Chloressigsäure oder Jodessigsäure die Katalyse, sondern auch die Aminosäuren. Die Aminosäuren zeigen eine kompetitive Hemmung der Katalyse. Hydrophobe Aminosäuren wie Tryptophan und Norleucin hemmen die Aminoacylase am stärksten. Weit schwächer wirken hydrophile Aminosäuren z.B. Glycin oder Threonin. Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen z.B. Glutaminsäure oder Lysin haben keinen Einfluß auf die Umsatzgeschwindigkeit. Tabelle 10 enthält ebenfalls die Hydrophobizitätsparameter [56] einiger Aminosäuren.

Tab. 10 Inhibitor-Konstanten verschiedener Aminosäuren der Hemmung der Hydrolyse von Gly-Ala durch Aminoacylase und Hydrophobizitätsparameter der Seitenketten der Aminosäuren nach Tanford [56].

Aminosäure	$10^4 \times K_i$ [Mol/l]*	pK_i	ΔF^{**} [kJ/Mol]	[kcal/Mol]
Tryptophan	1,2	3,91	12,55	3,0
Norleucin	1,2	3,90	11,30	2,7
Norvalin	1,3	3,87	9,16	2,19
Leucin	4,8	3,32	10,12	2,42
α -Aminobuttersäure	6,0	3,22	6,03	1,44
α -Aminoisobutters.	12,0	2,92	5,36 ⁺	1,28 ⁺
Valin	18,0	2,74	7,07	1,69
Phenylalanin	21,0	2,67	11,09	2,65
Alanin	32,0	2,49	3,05	0,73
Isoleucin	35,0	2,47	12,43	2,97
Glutamin	139,0	1,86	-0,4	-0,1
Glycin	180,0	1,74	0,0	0,0
Threonin	223,0	1,65	1,84	0,44

* Die K_i -Werte der Aminosäuren wurden auf der Basis der bei dem pH-Wert des Bestimmungsansatzes vorliegenden Konzentration an deprotonierter Aminosäure bestimmt.

** Einfluß der Seitenketten der Aminosäure auf die freie Energie bei der Überführung der Aminosäuren von Äthanol in Wasser nach Tanford [56].

⁺ Der ΔF -Wert wurde berechnet aus dem Wert für Alanin und dem Beitrag von 2,3 kJ/Mol für eine sekundäre Methylengruppe [56].

In Abbildung 18 wurden diese Hydrophobizitätsparameter gegen die ermittelten pK_1 -Werte der Aminosäuren aufgetragen. Die geradkettigen Aminosäuren: Glycin, Alanin, α -Aminobuttersäure, Norvalin und Norleucin lassen sich gut durch eine Kurve verbinden. Je hydrophober die Aminosäuren werden, umso stärker hemmen sie die Aminoacylase. Dagegen fallen die verzweigten Aminosäuren in ihrer Wirkung mehr oder weniger ab. Besonders deutlich wird dieses bei Norleucin und Isoleucin. Norleucin hemmt 30 mal stärker als Isoleucin.

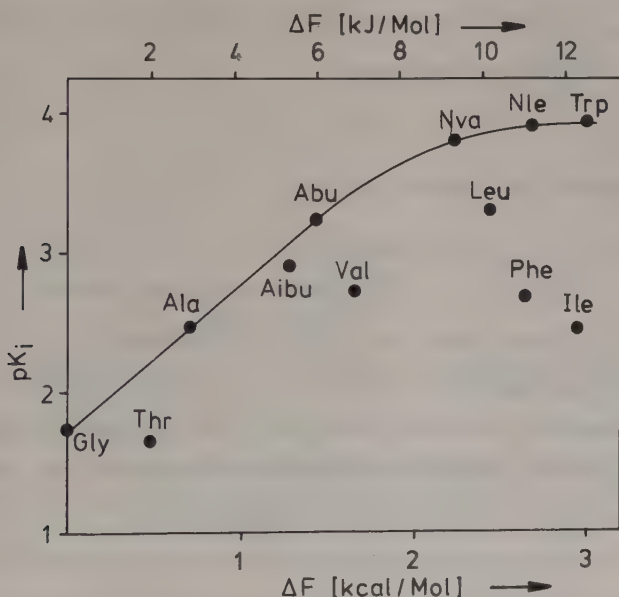


Abb. 18 Beziehung zwischen Inhibitorkonstanten und Hydrophobizitätsparametern der Seitenketten der Aminosäuren.

Beim Vergleich der app. K_m -Werte der Dipeptide untereinander sieht man, daß auch hier der app. K_m -Wert umso kleiner wird, je hydrophober die erste Aminosäure wird. Er fällt also von Gly-Leu nach Ala-Leu und nimmt nochmal nach Leu-Leu um das 20 fache ab. Aus diesem Grund hat das Dipeptid Thr-Ala den weitaus größten app. K_m -Wert. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit läuft jedoch nicht parallel zu den app. K_m -Werten. Betrachtet man den Einfluß der N-terminalen Aminosäure, so steigt zwar die Umsatzgeschwindigkeit von Threonin über Glycin nach Alanin, fällt jedoch wieder stark ab, wenn Leucin N-terminale Aminosäure ist. Das beste hier verwendete Dipeptid war Ala-Leu. N-Chloracetylalanin wird jedoch immer noch 4 mal schneller umgesetzt.

3.5. Reaktion des Enzyms mit DHT

DHT reagiert laut Literaturangaben [33, 34] schnell mit Histidin-, Tyrosin- und Lysinresten. Erst in jüngster Zeit wird darauf hingewiesen, daß auch Tryptophanreste in Proteinen von DHT angegriffen werden [57]. Auch bei unseren Untersuchungen zeigte sich, daß schon bei sehr kleinen Reagenzüberschüssen ein beträchtlicher Tryptophanverlust zu beobachten war. Das Ergebnis zeigt Abbildung 19.

Drei der zwölf Tryptophanreste der Aminoacylase reagieren, bereits mit DHT, ohne daß eine andere Aminosäure erfaßt wird. Schon ein 10 facher molarer Überschuß an DHT bei pH 5,5 genügt, um 2 Tryptophanreste, also ein Tryptophanrest pro Untereinheit, zu modifizieren. Diese beiden Trypto-

phanreste sind gegenüber DHT die reaktivsten Aminosäurereste in der Aminoacylase. Bei steigenden Reagenzüberschüssen beginnen die Lysinreste als nächste Aminosäure bei einem etwa 15 fachen molaren Überschuß mit DHT zu kuppeln. Ein 125 facher molarer Überschuß an DHT ist nötig, damit ein Tyrosinrest modifiziert wird, während Histidinreste erst bei einem 300 fachen molaren Überschuß an DHT anfangen, mit DHT zu reagieren.

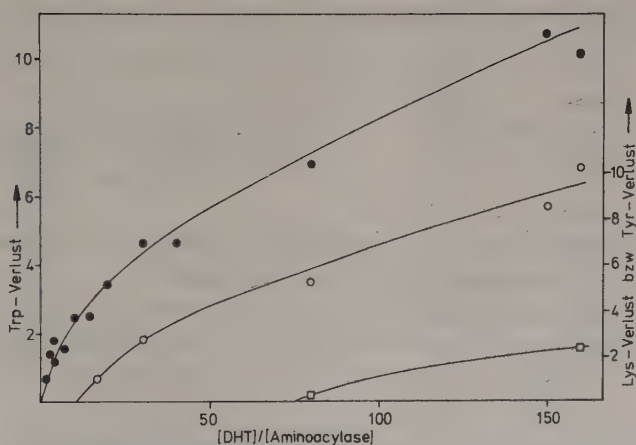


Abb. 19 Abhängigkeit des Modifizierungsgrades der Tryptophan-Lysin- und Tyrosinreste vom DHT-Überschuß. Reaktion von jeweils 1 mg Aminoacylase in 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,5 mit dem entsprechenden Überschuß an DHT bei Zimmertemperatur. ●—● Tryptophanverlust; ○—○ Lysinverlust; □—□ Tyrosinverlust.

Abbildung 20 zeigt die pH-Abhängigkeit der Reaktion von DHT mit Tryptophanresten der Aminoacylase bei verschiedenen Reagenzkonzentrationen. Aus dieser Abbildung erkennt man eine deutliche pH-Abhängigkeit der Reaktivität der Trypto-

phanreste mit DHT. Bei pH 5,5 verläuft die Modifizierung der Tryptophanreste am schnellsten und wird nach basischeren pH-Werten hin immer langsamer. Völlig analog dazu verhält sich auch die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms.

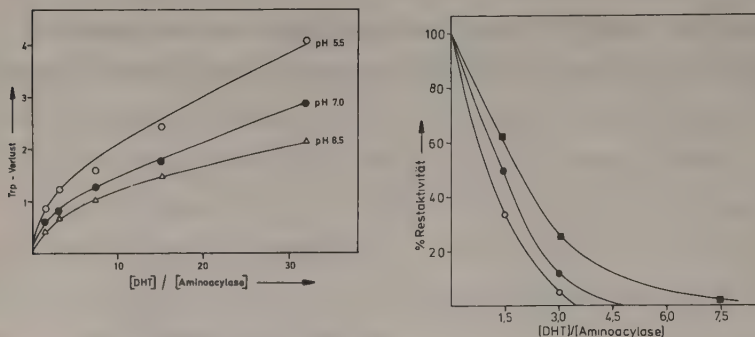


Abb. 20 pH-Abhängigkeit der Reaktion von DHT mit Tryptophanresten bei verschiedenen Reagenzüberschüssen.

Abb. 21 Einfluß des pH-Wertes der Kupplung von Aminoacylase mit verschiedenen DHT-Konzentrationen auf die Restaktivität des Enzyms. ○—○ pH 5,5; ●—● pH 7,0; ■—■ pH 8,5.

Auch hier wird das Enzym bei pH 5,5 erheblich schneller durch gleiche molare DHT-Überschüsse inaktiviert als bei pH 8,5. Zum andern zeigt die Lysinmodifizierung der Aminoacylase durch DHT ähnlich wie beim Papain nur eine geringe pH-Abhängigkeit. Die Lysinreste werden über den gesamten pH-Bereich fast gleich schnell angegriffen.

Da sich die SH-Gruppen der Aminoacylase nicht reversibel blockieren lassen und DHT auch Cysteinreste angreift [58], mußte der Einfluß dieses Reagenzes auf die SH-Gruppen ebenfalls untersucht werden. Abbildung 22 zeigt die Beziehung zwischen Aktivitätsverlust und Modifizierung der

SH-Gruppen durch DHT. Aus dieser Abbildung sieht man, daß keine lineare Beziehung zwischen Aktivitätsverlust und Modifizierung der SH-Gruppen besteht. Die Aktivität fällt viel schneller ab als die SH-Gruppen erfaßt werden.

Einen besseren Überblick über den Einfluß der Tryptophanmodifizierung und der parallelen Inaktivierung der Aminoacylase gibt Abbildung 23. Diese Abbildung zeigt noch einmal, daß Tryptophanreste besonders schnell mit DHT reagieren. Erst bei ungefähr 25 % Restaktivität knickt die Gerade ab und auch andere Tryptophanreste werden erfaßt.

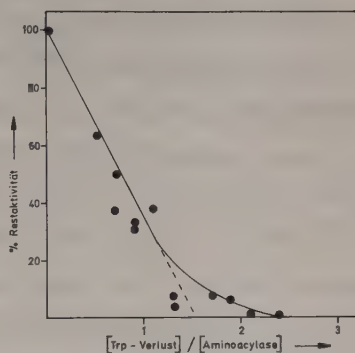
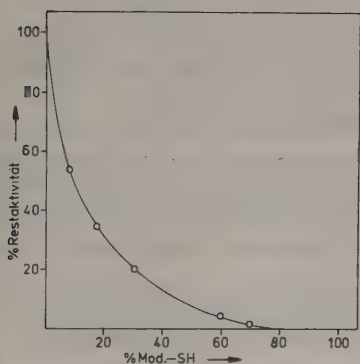


Abb. 22 Beziehung zwischen modifizierten SH-Gruppen und der Restaktivität der Aminoacylase. Die Restaktivität des Enzyms und der mit Ellman's Reagenz bestimmte Rest-SH-Gehalt wurde bei verschiedenen DHT-Überschüssen gegenüber der Kontrolle bestimmt.

Abb. 23 Beziehung zwischen Restaktivität und Tryptophanmodifizierungsgrad.

Extrapoliert man diese Gerade auf völligen Aktivitätsverlust, so schneidet sie die Abzisse bei einem Tryptophanverlust von 1,6. Die Modifizierung von einem Tryptophanmolekül pro Untereinheit genügt also, um die Aminoacylase völlig zu inaktivieren. Dabei ist es gleichgültig, ob die Aktivität mit N-Chloracetylalanin, N-Acetylmethionin oder Dipeptiden wie Gly-Ala oder Leu-Ala bestimmt wurde.

Jedoch schützen Inhibitoren die beiden besonders reaktiven essentiellen Tryptophanreste nicht vor dem Angriff von DHT. Ebenso verhindert TPCK, das, wie später gezeigt wird, die Aminoacylase als K_m -Inhibitor irreversibel inaktiviert, nicht die Kupplung der Tryptophanreste mit DHT. Auch die mit TPCK inaktivierten Proben zeigten den gleichen Tryptophanverlust wie die gleich behandelten Kontrollen.

Als nächstes wurde der Einfluß von DHT auf die Stabilität des Enzymproteins geprüft. Selbst bei einem relativ hohen 300 fachen molaren DHT-Überschuß denaturiert das Enzym nicht und die Enzymlösung bleibt klar. Abbildung 24 zeigt die immunochemische Untersuchung von Aminoacylaseproben, die mit DHT nur zum Teil oder völlig inaktiviert worden waren. Alle drei Proben zeigen zusammen mit der Kontrolle ein schönes Immunpräzipitat. Alle vier Präzipitate zusammen ergeben ein Quadrat. Das Bild zeigt keine Spornbildung oder doppelte Linien, die dann auftreten müßten, wenn die Aminoacylase in die Untereinheiten zerfallen würde.

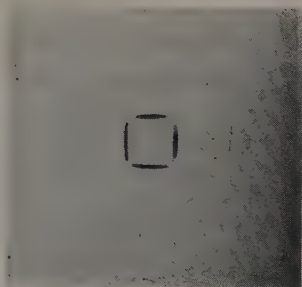


Abb. 24 Immundiffusionstest nach Ouchterlony. a). native Kontrolle b). 2 facher molarer DHT-Überschuß 25 % Restaktivität, c). 6 facher molarer DHT-Überschuß 1 % Restaktivität, d). 12 facher molarer DHT-Überschuß keine Restaktivität.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte kein Argininverlust bei der Einwirkung von DHT auf die Aminoacylase beobachtet werden. Die Argininreste eignen sich daher hervorragend als Bezugsamino­säure bei der Trennung der basischen Aminosäuren auf der kurzen Säule. Die Vermutung von HOWARD et al und HIGGINS et al [59, 60], daß Diazoniumionen relativ leicht mit Argininresten reagieren, konnte daher für DHT nicht bestätigt werden.

3.6. N-Bromsuccinimidoxidation

Da DHT schon bei einem sehr geringen molaren Überschuß Tryptophanmoleküle modifizierte, wurde untersucht, wie stark der Einfluß von NBS, einem weiteren Tryptophanreagenz, auf die Aminoacylase ist. Von besonderem Interesse war es wiederum, Ergebnisse über die Funktion und den Zustand der Tryptophanmoleküle zu erhalten. Bei NBS müssen jedoch höhere Reagenzüberschüsse angewendet werden, um die gleiche Anzahl von Tryptophanresten zu erfassen. Auch bei diesem Reagenz werden zuerst nur Tryptophanmoleküle oxidiert. Erst bei einem höheren molaren Reagenzüberschuß reagieren auch Tyrosin-

und Histidinreste [61]. Abbildung 25 zeigt die Beziehung zwischen der Tryptophan-, Tyrosin- und Histidinmodifizierung und dem molaren Überschuß an Reagenz.

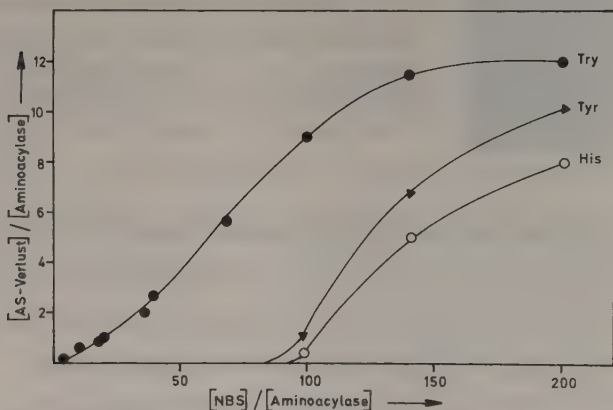


Abb. 25 Abhängigkeit des Modifizierungsgrades von Tryptophan-Histidin- und Tyrosinresten vom NBS-Überschuß. Reaktion von jeweils 1 mg Aminoacylase in 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0, der 1 m an Harnstoff war, mit den entsprechenden molaren Überschüssen an NBS bei Zimmertemperatur.

Bis zu einem 100 fachen molaren Überschuß werden weder Histidin- noch Tyrosinreste angegriffen. Bei einem 40 fachen molaren Überschuß an NBS werden 2 Tryptophanreste oxidiert und bei einem 100 fachen molaren Überschuß 9 der 12 Tryptophanreste erfaßt. Um alle Tryptophanreste zu oxidieren ist ein 200 facher molarer Überschuß an Reagenz erforderlich. Diese NBS-Konzentration oxidiert auch 8 der 24 Histidinreste und 10 der 20 Tyrosinreste. Bei geringen NBS-Überschüssen werden zuerst relativ langsam 2 Tryptophanmoleküle erfaßt; dann steigt die Modifizierungsgeschwindigkeit der nachfolgenden Tryptophanreste an.

Die Anzahl der oxidierten Tryptophanreste ist ebenfalls leicht photometrisch bestimmbar. Daher wurden bei verschiedenen Reagenzüberschüssen Spektren von 320 nm bis 230 nm aufgenommen. Jedoch hatte die Einwirkung von NBS auf die Aminoacylase einen wesentlichen Einfluß auf ihre Stabilität. So trübten sich die Proben bis zu einem 100 fachen molaren Reagenzüberschuß in steigendem Maß und bei Proben mit noch höherem Überschuß fiel kurz nach der Reagenzzugabe Protein aus. Da höhere NBS-Überschüsse zur Spaltung der Polypeptidkette führen, wurde über SDS-Elektrophoresen kontrolliert, ob die Inaktivierung der Aminoacylase durch NBS eine Folge der Spaltung der Proteinkette und nicht der Oxidation der Tryptophanreste ist. Bis zu einem 50 fachen molaren Überschuß in Gegenwart von 1 m Harnstoff konnte keine signifikante Spaltung der Polypeptidkette beobachtet werden. Mit steigendem NBS-Überschuß fand parallel zur Trübung der Enzymlösung eine Spaltung der Proteinkette statt. Damit war eine zuverlässige Kontrolle der SH-Gruppen, die auch langsam von NBS oxidiert werden [62], mit Ellman's Reagenz nicht mehr möglich. Ebenfalls verhinderte diese langsame Denaturierung des Enzyms die photometrische Bestimmung der modifizierten Tryptophanreste bei höheren Reagenzüberschüssen. So wurde auch hier wieder die Tryptophanmodifizierung hauptsächlich mit dem Aminosäureanalysator ausgewertet. Abbildung 26 zeigt die Abhängigkeit der Restaktivität von dem Tryptophanverlust bei der NBS-Oxidation. Extrapoliert man hier die zu Beginn lineare Abnahme der Aktivität weiter bis zum völligen Aktivitätsverlust, so schneidet auch diese Gerade bei einem

Tryptophanverlust von 2 Molekülen pro Enzym die Tryptophanachse. Schon nach einem Aktivitätsverlust von etwa 40 % beginnen neben den essentiellen Tryptophanen andere Tryptophanreste mit NBS zu reagieren und die anfängliche lineare Aktivitätsabnahme geht in eine Kurve über.

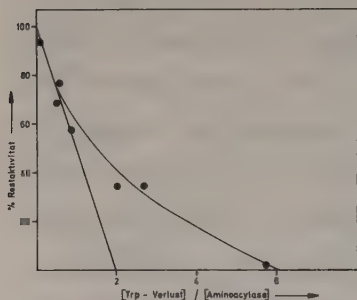


Abb. 26 Beziehung zwischen Restaktivität und Tryptophanmodifizierungsgrad.

3.7. Nitrierung der Aminoacylase mit TNM

Wie das Reaktionsschema in 2.6.5. zeigt, reagiert TNM mit verschiedenen Aminosäuren. Neben seiner nitrierenden Wirkung hat es noch oxidierende Eigenschaften. Dadurch greift es auch SH-Gruppen und Methioninreste an [63]. TNM kann die Tyrosinreste des Enzyms nitrieren als auch über einen radikalischen Mechanismus quervernetzen [64, 65]. Abbildung 27 zeigt den Einfluß von steigenden molaren Überschüssen auf die Tyrosin- und Tryptophanreste der Aminoacylase.

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß schon bei einem 10 fachen molaren Überschuß von TNM die Modifizierung der Tyrosinreste beginnt. Bei dem gleichen Überschuß beginnt auch

das Reagenz die Tryptophanreste anzugreifen. Bei einem 30 fachen molaren Überschuß sind schon 3 der 12 in der Aminoacylase vorhandenen Tryptophanreste und 4 der 20 Tyrosinreste modifiziert worden. Erst bei diesem Reagenzüberschuß beginnt die Bildung der Nitrotyrosine. Das heißt, bevor die Nitrotyrosinbildung beginnt, sind schon 4 Tyrosinreste durch TNM quervernetzt worden. Sind bei einem 40 fachen molaren TNM-Überschuß 3 Nitrotyrosine entstanden, so nimmt die Geschwindigkeit der Nitrierung der übrigen Tyrosinreste stark ab. Bei einem 150 fachen molaren Überschuß sind noch nicht ganz 4 Nitrotyrosine entstanden. Ebenso werden bis zu einem 50 fachen molaren TNM-Überschuß relativ schnell 4 Tryptophanreste erfaßt, während die übrigen Tryptophanreste nur langsam modifiziert werden.

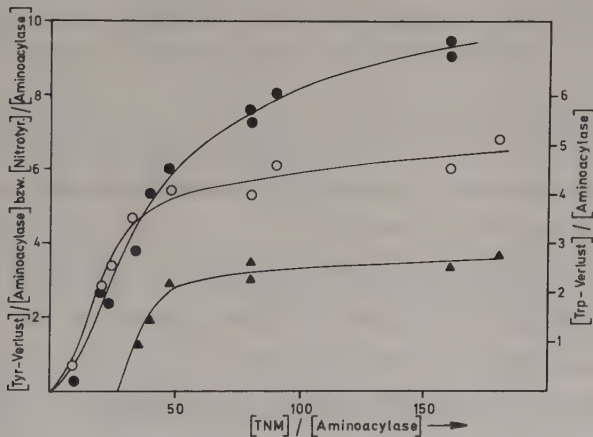


Abb. 27 Abhängigkeit des Modifizierungsgrades von Tryptophan und Tyrosin und der Bildung von Nitrotyrosin vom TNM-Überschuß. Reaktion von jeweils 1 mg Enzym bei pH 8,0 mit den entsprechenden Überschüssen an TNM. ○—○ Tryptophanabnahme, ●—● Tyrosinabnahme, ▲—▲ Nitrotyrosinentstehung.

TNM wirkt auf die SH-Gruppen des Enzyms als Oxidationsmittel. Schon bei geringen molaren Überschüssen werden daher die essentiellen SH-Gruppen oxidiert. Bei einem 10 fachen molaren Reagenzüberschuß können bereits keine SH-Gruppen mehr mit Ellman's Reagenz erfaßt werden. Ebenfalls zeigt die Aminoacylase keine Aktivität mehr.

Die pH-Abhängigkeit der Quervernetzung und der Nitrotyrosinbildung geben einigen Aufschluß über das Enzymprotein. Daher wurde die pH-Abhängigkeit des Modifizierungsgrades der Tyrosine und auch der Tryptophane bei drei verschiedenen molaren Reagenzüberschüssen untersucht. Betrachtet man die Tyrosinmodifizierung (Abb. 28), so sieht man, daß bei allen drei Reagenzkonzentrationen mit steigendem pH-Wert mehr Tyrosine erfaßt werden. Oberhalb von pH 9,0 wird jedoch der Anstieg der Kurve flacher. Bei einem 60 fachen molaren Überschuß nimmt sogar die Anzahl der erfaßten Tyrosine gegenüber pH 9,0 wieder ab. Bei der Nitrotyrosinbildung in Abbildung 29 wird dieses Verhalten noch deutlicher. Auch hier steigt wieder die Anzahl der gebildeten Nitrotyrosine bei allen drei TNM-Überschüssen von pH 7,0 bis pH 9,0 an. Von pH 9,0 nach pH 9,5 fällt jedoch die Anzahl der entstandenen Nitrotyrosine. Besonders deutlich wird das wieder bei der mittleren Konzentration.

Die Differenz zwischen Tyrosinverlust und Nitrotyrosinbildung zeigt Abbildung 30. Auch hier erhalten wir ein ähnliches Bild. Bei einem 30 fachen molaren Reagenzüberschuß steigt zwar die Quervernetzung von pH 7,0 bis pH 9,5; bei einem 60 fachen molaren TNM-Überschuß nimmt jedoch auch die Quervernetzung von pH 7,0 bis pH 8,5 zu und dann wieder nach pH 9,5 ab.

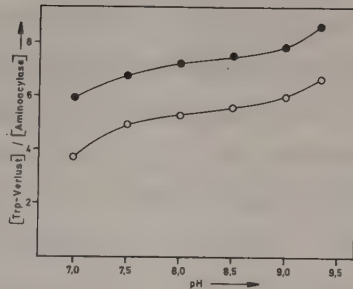
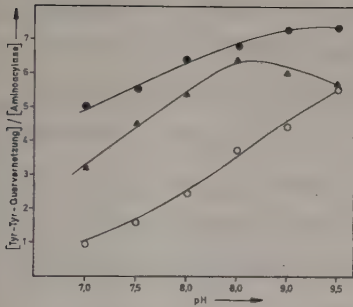
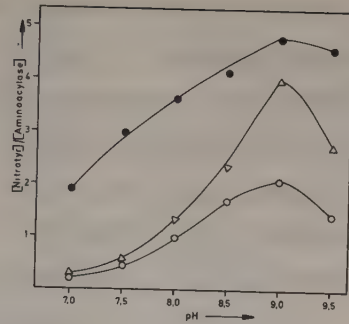
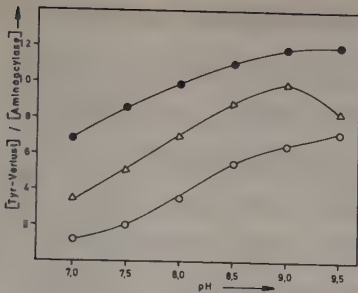


Abb. 28 pH-Abhängigkeit der Modifizierung von Tyrosinresten mit TNM bei verschiedenen Überschüssen. ●—● 150 facher TNM-Überschuß; △—△ 60 facher TNM-Überschuß; ○—○ 30 facher TNM-Überschuß.

Abb. 29 pH-Abhängigkeit der Bildung von Nitrotyrosin bei der Einwirkung von TNM auf Aminoacylase bei verschiedenen Überschüssen. ●—● 150 facher TNM-Überschuß; △—△ 60 facher TNM-Überschuß; ○—○ 30 facher TNM-Überschuß.

Abb. 30 pH-Abhängigkeit der Tyr-Tyr-Quervernetzung (Differenz zwischen Tyrosinabnahme und Nitrotyrosinzunahme) bei verschiedenen TNM-Überschüssen. ●—● 150 facher TNM-Überschuß; △—△ 60 facher TNM-Überschuß; ○—○ 30 facher TNM-Überschuß.

Abb. 31 pH-Abhängigkeit der Modifizierung von Tryptophanresten mit TNM bei verschiedenen Überschüssen. ●—● 150 facher TNM-Überschuß; ○—○ 60 facher TNM-Überschuß.

Ein anderes Ergebnis zeigt die pH-Abhängigkeit der Tryptophanmodifizierung. Wie Abbildung 31 zeigt, werden die Tryptophanreste mit steigenden pH-Werten stärker modifiziert. Hier steigt sogar die Anzahl der nitrierten Moleküle von pH 9,0 auf pH 9,5 noch einmal relativ stark an. Die Kurven bei einem 60 fachen und 150 fachen molaren TNM-Überschuß verlaufen über den gesamten pH-Bereich parallel zueinander.

Wie die Abbildungen zeigen, entstehen bei der Einwirkung von TNM auf die Aminoacylase relativ wenig Nitrotyrosin und viele Quervernetzungen. Bei einem 150 fachen molaren Reagenzüberschuß werden bei pH 7,3 3 Nitrotyrosine gebildet aber beinahe 6 Tyrosine sind über Quervernetzungen verknüpft. Mit Hilfe der SDS-Elektrophorese wurde untersucht, ob die Quervernetzung nur innerhalb der Untereinheiten stattfindet, oder auch die Untereinheiten untereinander verknüpft werden. Bei niedriger Quervernetzung des Enzymproteins erhält man fast ausschließlich nur ein Proteinpeak, der dem Molekulargewicht der Untereinheit entspricht. Selbst bei hohen Quervernetzungen von 7 bis 8 Tyrosinresten erscheint nur eine sehr kleine Menge (max. 10 %) als Peak, der dem des Molekulargewichts der Aminoacylase entspricht.

Bei den hier verwendeten TNM-Überschüssen traten zu keinem Zeitpunkt Lösungsschwierigkeiten des Enzymproteins auf. Auch wurde die Stabilität der Aminoacylase nicht derart beeinflusst, daß das Enzymprotein während oder kurz nach der TNM-Einwirkung ausfiel.

3.8. Funktion und Reaktivität der Lysinreste

Die Substrate der Aminoacylase, Dipeptide und N-Acylamino-säuren müssen, um umgesetzt zu werden, eine freie Carboxylgruppe haben. Wie gezeigt wurde, spaltet die Aminoacylase keine Dipeptidester oder -amide. Daher wurde nach Gruppen im Enzymmolekül gesucht, die für die Bindung dieser freien Carboxylgruppe in Betracht kommen. Da sich Lysinreste wegen ihrer positiv geladenen ϵ -Aminogruppe anbieten, wurde die Aminoacylase mit TNBS modifiziert, einem Reagenz, das schnell und selektiv mit freien Aminogruppen reagiert. Zum andern kann man das Reaktionsprodukt leicht photometrisch bestimmen [41]. Hier zeigte sich jedoch ein großer Unterschied zwischen den photometrisch bestimmten Werten und den über die Aminosäureanalyse ermittelten. Bei der optischen Methode erhält man etwa 50 % mehr modifizierte Lysinreste.

Für die Aminosäureanalyse muß das Reaktionsprodukt zuerst reduziert werden, da das entstandene Trinitroanilinderivat ungefähr die Reaktivität einer Säureamidgruppe hat und somit bei der sauren Hydrolyse fast quantitativ wieder gespalten wird. Abbildung 32 zeigt, daß relativ viele Lysinreste erfaßt werden, bevor das Enzym seine Aktivität verloren hat. Essentielle Lysinreste werden kaum schneller erfaßt als alle 12 hier modifizierten Lysinreste.

Die für die Aktivität essentiellen SH-Gruppen werden entweder durch das wegen seiner 3 Nitrogruppen doch recht geräumige Reagenz nicht im aktiven Zentrum des Enzyms erfaßt, oder das Reaktionsprodukt wird sofort wieder gespalten.

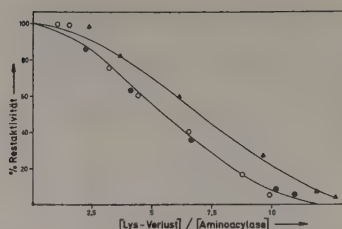
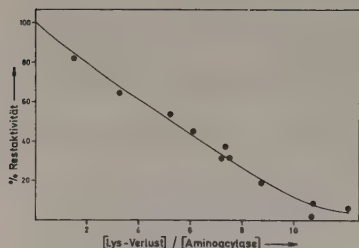


Abb. 32 Abhängigkeit der Restaktivität von der Anzahl der durch TNBS modifizierten Lysinreste. Der Lysinverlust wurde mit dem Aminosäureanalysator bestimmt.

Abb. 33 Abhängigkeit der Restaktivität von der Anzahl der durch ^{14}C -Essigsäureanhydrid modifizierten Lysinreste.

▲—▲ pH 8,5; ●—● pH 7,5; ○—○ pH 6,5.

Völlig analog zur TNBS-Modifizierung verlief die Inaktivierung mit Essigsäureanhydrid. Da Essigsäureanhydrid schon in relativ kleinen Konzentrationen die Aminoacylase inaktivierte, wurde bei pH 8,5 eine quantitative Bestimmung der modifizierten Lysinreste durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 33. Die hier erhaltene Kurve stimmt gut mit der Abbildung 32 überein. Zur Prüfung, ob bei niedrigeren pH-Werten die Inaktivierung etwas selektiver verläuft, wurde nochmals das Enzym bei pH 7,5 und pH 6,5 mit Essigsäureanhydrid inkubiert. Wie die Abbildung zeigt, treten jedoch keine wesentlichen Unterschiede auf.

Die Aminoacylase bindet solche Substrate oder Hemmstoffe am besten, die einen hydrophoben Acylrest haben. Diese Bedingung erfüllen die käuflichen Chlormethylketone TPCK und TLCK. Wie aus den Versuchen mit N-Tosylalanin hervorgeht, wird die Sulfonsäureamidbindung zwar gebunden aber nicht mehr gespal-

ten [11]. Die Experimente zeigen, daß beide Chlormethylketone mit der Aminoacylase reagieren und sie inaktivieren. In einem Modellversuch, bei dem N^{α} -Acetyllysin unter gleichen Bedingungen in einem 0,2 m Carbonatpuffer pH 9,5 mit TPCK umgesetzt wurde, konnte keine Reaktion des Lysinderivates mit TPCK festgestellt werden. Um zu beweisen, daß Lysinreste mit den Chlormethylketonen reagieren, wurde eine pH-Abhängigkeit der Inaktivierung aufgenommen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 34. Die Kurve bildet nur den ansteigenden Ast einer Titrationskurve. Da die Aminoacylase oberhalb pH 10,0 sehr schnell denaturiert, waren bei einem höheren pH-Wert keine Messungen mehr möglich. Aus der erhaltenen Kurve konnte jedoch noch nicht der pK-Wert bestimmt werden. Daher wurden die Meßwerte nach Lindley [51] aufgetragen (Abb. 35). Daraus ergibt sich ein pK-Wert von $pK = 10,4$.

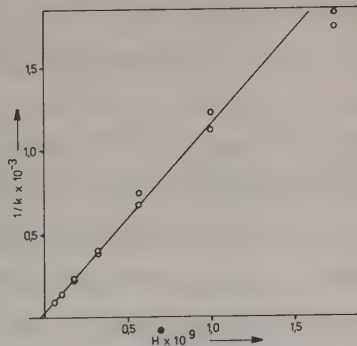
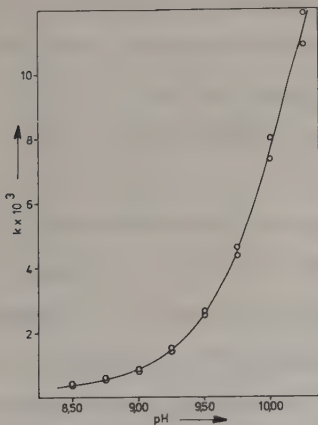


Abb. 34 pH-Abhängigkeit der Lysinmodifizierung durch TPCK bei pH-Werten von pH 8,5 bis pH 10,25.

Abb. 35 Lindley-Diagramm der Werte aus Abb. 34.

Substrate oder kompetitive Hemmstoffe konkurrieren mit dem Chlormethylketon um die Bindung im aktiven Zentrum der Aminoacylase. Daher hemmen auch diese die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Aminoacylase durch TPCK. Abbildung 36 zeigt das Ergebnis mit verschiedenen Konzentrationen an Norleucin als kompetitiven Inhibitor.

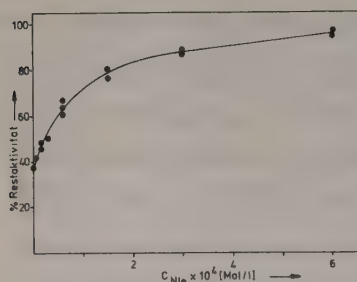


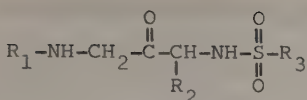
Abb. 36 Einfluß von Norleucin auf die Inaktivierung der Aminoacylase durch TPCK bei verschiedenen Norleucinkonzentrationen ($1,5 \times 10^{-5} \text{ m}$ bis $6 \times 10^{-4} \text{ m}$). Reaktionszeit: 10 Minuten bei 40°C .

Die Kurve verdeutlicht, daß schon geringe Norleucinkonzentrationen die Inaktivierungsgeschwindigkeit durch TPCK verlangsamen. Bei gleicher TPCK- und Norleucinkonzentration ist die Inaktivierung von 35 % Restaktivität am Anfang auf 70 % Restaktivität zurückgegangen. Höhere Konzentrationen an Norleucin verhindern fast vollständig die Inaktivierung der Aminoacylase durch TPCK. Die Chlormethylketone stellen sich somit als ausgezeichnete K_m -Inhibitoren heraus, mit deren Hilfe bestimmt werden sollte, wieviele Lysinreste pro Enzymmolekül reagieren. Da kein radioaktives TPCK vorhanden war, wurde der Lysinverlust mit dem Aminosäureanalysator bestimmt. Bei der Reaktion entsteht ein an beiden Stickstoffatomen substituiertes 1,3-Diaminoacetonderivat:

R_1 = Lys-Rest

R_2 = Phe-Rest

R_3 = Tos-Rest



Bei der sauren Hydrolyse spaltet nun nicht nur der Tosyl-rest ab, sondern auch das Keton wird zum Teil gespalten und es entsteht wieder Lysin. Daher mußte vor der Hydrolyse das Keton mit $NaBH_4$ zum Alkohol reduziert werden. Dieser ist bei der sauren Hydrolyse stabil und der Lysinverlust kann nun über Aminosäureanalyse bestimmt werden. Abbildung 37 zeigt den Lysinverlust mit TPCK.

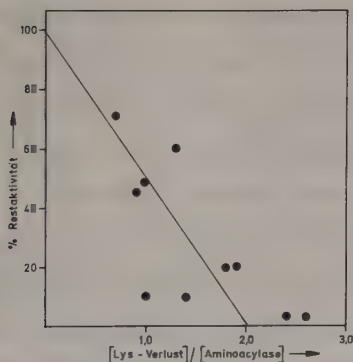


Abb. 37 Beziehung zwischen Restaktivität und Lysinverlust durch TPCK-Modifizierung. Bestimmung des Lysinverlusts durch Aminosäureanalyse.

Auch bei doppelt so langer Inkubationszeit, die nötig war, um das Enzym völlig zu inaktivieren, trat kein höherer Lysinverlust auf. Die etwas größere Streuung der Punkte ist darauf zurückzuführen, daß der Lysinverlust (max. 2 von 34) bestimmt wurde. Trägt man die Restaktivität gegen den Lysinverlust auf, so ergibt es eine Gerade, die bei 2 modifizierten Lysinreste schneidet. Da kein Histidin und Tyrosinverlust beobachtet werden konnte, bekräftigt dieser Versuch noch einmal die Annahme, daß ein Lysinrest für die Katalyse essentiell ist.

3.9. Acetylierung mit N-Acetylimidazol

Um die Rolle von Tyrosinresten für die Aktivität der Aminoacylase zu untersuchen, wurde diese mit NAI acetyliert, eine Reaktion, die keinen Einfluß auf die essentiellen SH-Gruppen hatte, da diese sofort wieder deacetyliert wurden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 38. Man muß sehr hohe Überschüsse an NAI verwenden, um die Aminoacylase zu inaktivieren. Bei diesen Versuchen wurde die Restaktivität eine halbe Stunde nach der Reagenzzugabe und nach der Dialyse bestimmt, um auszuschließen, daß bei der Dialyse reaktivere Tyrosinreste wieder deacetyliert werden. Beide Aktivitätstests stimmen gut überein. Zum andern können bei hohen NAI-Überschüssen auch Lysinreste acetyliert werden. Diese werden aber bei der photometrischen Bestimmung nach 2.6.6. nicht erfaßt. Daher wurden die modifizierten Proben und die Kontrolle mit einem 500 fachen molaren Überschuß an DHT versetzt und auf diese Weise die Anzahl der acetylierten Tyrosin- und Lysinreste indirekt bestimmt. Die Kurve zeigt, daß beide Bestimmungsmethoden im Falle des Tyrosins gut übereinstimmen. Gleichzeitig wird deutlich, daß auch eine beträchtliche Anzahl Lysinreste reagiert. Die Acetylierung der Lysinreste beginnt kurz nach der Modifizierung der Tyrosinreste. Bei einem 300 fachen molaren NAI-Überschuß reagieren jedoch schon ebensoviele Lysinreste wie Tyrosinreste. Die Tyrosinreste werden nur sehr langsam von NAI erfaßt. Selbst bei einem 1000 fachen molaren Reagenzüberschuß haben noch nicht ganz 5 der 20 in der Aminoacylase vorhandenen Tyrosinreste reagiert.

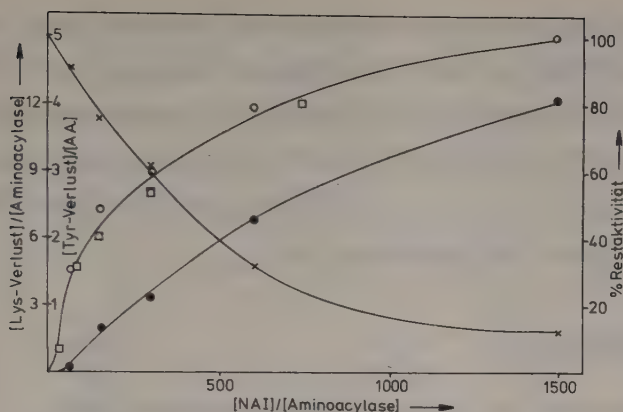
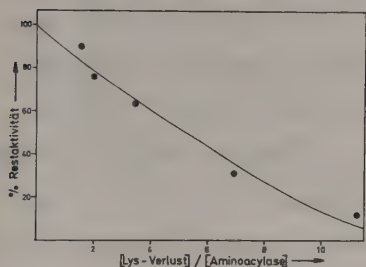


Abb. 38 Abhängigkeit der Tyrosin- und Lysinacetylierung vom N-Acetylimidazol-Überschuß. Reaktion von jeweils 1 bzw. 2 mg Aminoacylase in 0,05 m Boratpuffer pH 7,5 mit den entsprechenden Überschußen an NAI.



□—□ Tyrosinmodifizierung photometrisch bestimmt; ○—○ Tyrosinmodifizierung mit Aminosäureanalyse bestimmt; ●—● Lysinmodifizierung mit Aminosäureanalyse bestimmt; ×—× % Restaktivität des Enzyms bei den jeweiligen NAI-Überschüssen.

Abb. 39 Abhängigkeit der Restaktivität von der Anzahl der modifizierten Lysinreste. Die Kurve ist identisch mit der Kurve aus Abb. 32. Die hier eingezeichneten Punkte entsprechen der Anzahl der durch NAI acetylierten Lysinreste.

Abbildung 39 zeigt, daß die Inaktivierung der Aminoacylase durch NAI hauptsächlich auf die Modifizierung der essentiellen Lysinreste zurückzuführen ist. Da NAI wie TNBS die an der Oberfläche des Enzyms sitzenden Lysinreste erfaßt, erhält man hier die gleiche Kurve wie in Abbildung 33, wenn

man die Restaktivität gegen die Anzahl der modifizierten Lysinreste aufträgt. An der katalytischen Reaktion der Aminoacylase ist demnach kein Tyrosinrest direkt beteiligt. Zum andern liegt der größte Teil der Tyrosinreste, wie die geringe Erfassung durch NAI zeigt, offensichtlich gut abgeschirmt im Innern des Enzymmoleküls.

3.10. Photooxidation

Bei der Photooxidation werden, wie das Reaktionsschema in 2.6.9. zeigt, nicht nur Histidinreste im Enzymmolekül zerstört. Es werden, wie WEIL und Mitarbeiter [42] zeigten, auch Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Methionin oxidiert. Abbildung 40 zeigt das Ergebnis der Photooxidation der Aminoacylase. Aus dem Diagramm geht hervor, daß unter den Reaktionsbedingungen keine Tyrosinreste oxidiert werden. Auch die Methioninreste der Aminoacylase werden kaum angegriffen. Nur sehr langsam werden die für die enzymatische Katalyse essentiellen SH-Gruppen modifiziert. Viel schneller reagieren dagegen die Histidin- und die Tryptophanreste. Bei pH 7,5 werden über die gesamte Reaktionszeit etwa doppelt so viele Histidin- wie Tryptophanreste erfaßt. Da die Aminoacylase jedoch 12 Tryptophan- und 24 Histidinreste enthält, werden beide Aminosäuren etwa gleich schnell zerstört. So sind nach 20 Minuten zwar 4 Histidin- und 2 Tryptophanreste oxidiert worden, jedoch noch keine SH-Gruppen.

Um unterscheiden zu können, ob die Abnahme der Tryptophanreste, die ja, wie in 3.5. gezeigt, essentiell für die Aktivität des Enzyms sind, oder die Histidinmodifizierung für

die Inaktivierung verantwortlich sind, wurde eine pH-Abhängigkeit des Modifizierungsgrades von Tryptophan und Histidin aufgenommen. Abbildung 41 zeigt die unterschiedliche Geschwindigkeit, mit der Histidinreste bei pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 oxidiert werden.

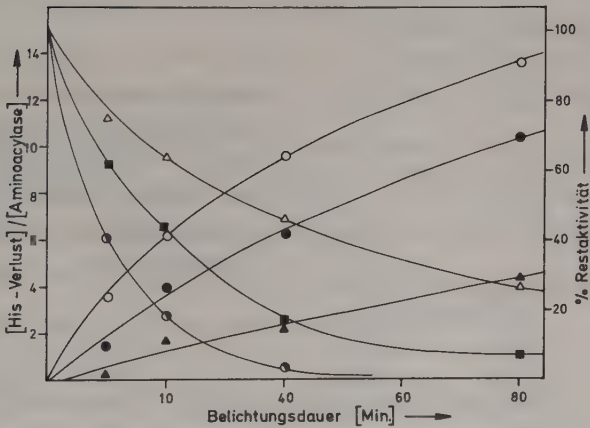
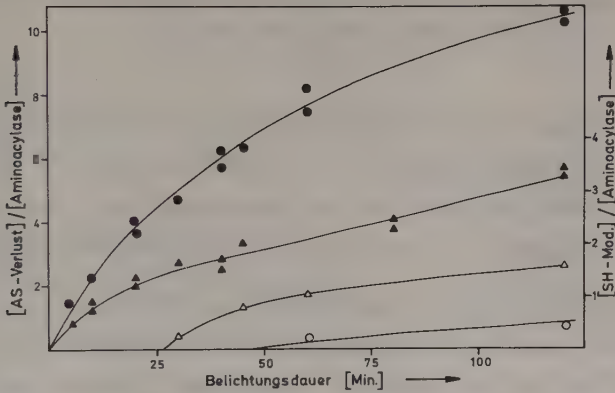


Abb. 40 Abhängigkeit der Modifizierung von Histidin-, Tryptophan-, Methionin- und Cysteinresten von der Belichtungs-
dauer. Reaktion von jeweils 1 mg Enzym in 0,1 m Phosphat-
Boratpuffer pH 7,5. Gestartet wurde die Reaktion durch Zu-

gabe von Metylenblau. ●—● oxidierte Histidinreste;

▲—▲ oxidierte Tryptophanreste; ○—○ oxidierte Methioninreste; △—△ oxidierte Cysteinreste.

Abb. 41 Abhängigkeit der Histidinmodifizierung und der Inaktivierung der Aminoacylase von der Belichtungsdauer bei verschiedenen pH-Werten. ▲—▲ Histidinverlust bei pH 6,0;

●—● Histidinverlust bei pH 7,0; ○—○ Histidinverlust bei pH 8,0; △—△ Restaktivität bei pH 6,0; ■—■ Restaktivität bei pH 7,0; ●—● Restaktivität bei pH 8,0.

Völlig analog zu dieser Modifizierungsgeschwindigkeit verhält sich die Geschwindigkeit der Inaktivierung des Enzyms. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Geschwindigkeit der Oxidation der Histidinreste zu. Ebenfalls steigt die Geschwindigkeit der Inaktivierung mit steigenden pH-Werten.

Ganz anders verhält sich dagegen die pH-Abhängigkeit der Oxidation der Tryptophanreste. Abbildung 42 zeigt, daß die Tryptophanoxidation praktisch in dem untersuchten pH-Bereich nicht vom pH-Wert abhängt.

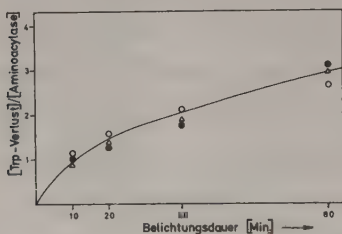


Abb. 42 Abhängigkeit der Tryptophanmodifizierung von der Belichtungsdauer bei verschiedenen pH-Werten.

●—● pH 6,0; △—△ pH 7,0;
○—○ pH 8,0.

Da Histidinreste bevorzugt oberhalb pH 7,0 angegriffen werden, also bei einem pH-Wert, bei dem der Imidazolring als freie Base vorliegt, kann man nach WEIL et al [45] den pK-Wert des modifizierten Histidinrestes bestimmen. Abbildung

43 zeigt das pH-Profil der Histidinmodifizierung bei der Photooxidation. Es ergibt sich ein pK-Wert von $pK = 7,0 \pm 0,2$, also ein ganz "normaler" pK-Wert für Histidin.

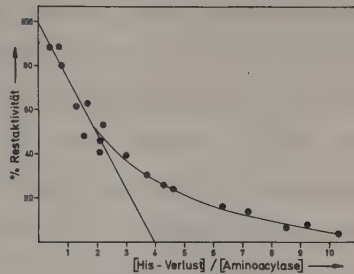
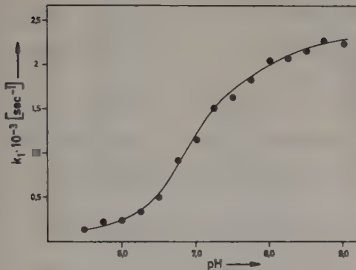


Abb. 43 pH-Abhängigkeit der Histidinmodifizierung durch Photooxidation mit Methylenblau.

Abb. 44 Beziehung zwischen Restaktivität und Histidinmodifizierung durch Photooxidation bei pH 7,5.

Das Verhältnis zwischen Modifizierungsgrad und Restaktivität zeigt Abbildung 44. Extrapoliert man die anfängliche lineare Abnahme der Restaktivität bis zur völligen Inaktivierung der Aminoacylase, so schneidet die Gerade die Abzisse bei einem Histidinverlust von 4 Histidinresten, also 2 Histidinresten pro Untereinheit. Da die Oxidation der SH-Gruppen der Aminoacylase erst anfängt, nachdem bereits 5 Histidinreste erfaßt worden sind, beruht also die Inaktivierung der Aminoacylase auf der Zerstörung der Histidinreste.

3.11. Reaktion der Histidinreste mit Diäthylpyrocarbonat

Diäthylpyrocarbonat reagiert, wie MELCHIOR und FARNEY [48] zeigen konnten, mit Imidazolresten im Protein zu N-Äthoxyformylderivaten, deren Bildung man aus der Absorption zwischen 230 und 240 nm quantitativ bestimmen kann. Da DEP auch mit Lysin- und Tyrosinresten reagiert, wurde die Modifizierung bei pH 5,0 durchgeführt, um eine Reaktion mit Lysinresten zu vermeiden. Die Differenzspektren zeigten bei 270 nm keine Abnahme der Extinktion, daher konnte angenommen werden, daß keine Tyrosinreste modifiziert wurden. Mit Hydroxylamin läßt sich das N-Äthoxyformylderivat des Imidazols leicht deacylieren. Daher wurden einige Proben über Nacht gegen Puffer dialysiert, der 0,1 m an Hydroxylamin war. Die Extinktionskoeffizienten für das N-Äthoxyformylderivat schwanken in der Literatur sehr stark: MÜHLRAD et al [47] $\epsilon_{240} = 3,2 \times 10^3$ [$1 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]; HOLBROOK und INGRAM [66] $\epsilon_{240} = 3,6 \times 10^3$ [$1 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]; RÖHM [67] $\epsilon_{240} = 13,8 \times 10^3$ [$1 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]. In dieser Untersuchung wurde der Extinktionskoeffizient von K.H. RÖHM zu Grunde gelegt, da bei diesem Extinktionskoeffizienten die Ergebnisse bei der Modifizierung mit Diäthylpyrocarbonat in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Photooxidation stehen. Abbildung 45 zeigt die Abhängigkeit der Restaktivität von der Anzahl der modifizierten Histidinreste. Extrapoliert man die Anfangsgerade bis zum völligen Aktivitätsverlust, so schneidet sie bei einem Histidinverlust von 4 Histidinresten die Abzisse.

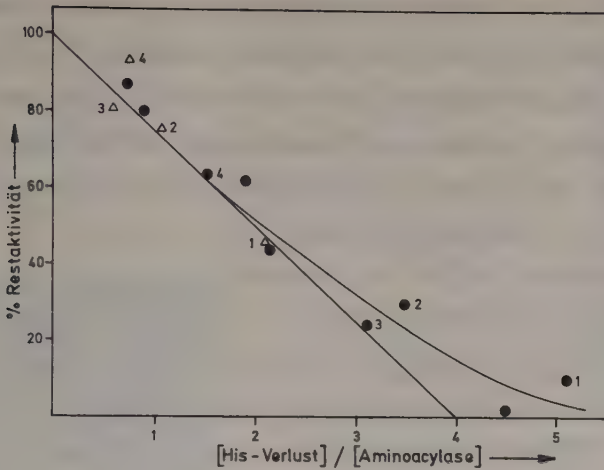


Abb. 45 Beziehung zwischen Restaktivität und Modifizierungsgrad der Histidinreste durch DEP. ●—● Anzahl der mit DEP modifizierten Histidinreste. Δ—Δ Mit Hydroxylamin wieder aktivierte Proben. Die gleiche Zahl zeigt die jeweilige Probe vor und nach der Hydroxylamineinwirkung.

Die Modifizierung der 4 Histidinreste verläuft sehr selektiv. Sind 5 Histidinreste erfaßt worden, so hat die Aminocyclase nur noch 5 % Restaktivität. Hydroxylamin spaltet den N-Äthoxyformylrest langsam wieder ab und in dem Maße, in dem native Histidinreste wieder entstehen, gewinnt auch die Aminocyclase ihre Aktivität wieder.

3.12. Vergleichende Untersuchungen der Aminocyclase vor und nach Behandlung mit Chelatbildnern

Dialysiert man die Aminocyclase gegen Puffer, die Metallkomplexbildner enthalten, so beobachtet man, daß das Enzym nur sehr langsam sein Metall verliert. Nach 24 Stunden Dia-

lyse bei 4°C gegen einen 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer, der 1 mM anPhenanthrolin ist, hat das Enzym ungefähr 5 % Restaktivität. EDTA zeigt sogar einen noch viel schwächeren Effekt. Bei der Dialyse bei 4°C gegen einen 0,1 m Phosphat-Borat-Puffer, der 10 mM an EDTA ist, zeigt das Enzym nach 24 Stunden ca. 30 % Restaktivität.

Auch die Tatsache, daß bei der gesamten Präparation des Enzyms in keinem Schritt ein Metallsalz zugegeben werden muß, zeigt, daß die Aminoacylase das Metall sehr fest bindet. Ebenso schnell nimmt das Enzym auch das für die Katalyse essentielle Metallion wieder auf. Bei der Zugabe des gegen Phenanthrolin dialysierten Enzyms zu einem Aktivitätstest, der 10^{-5} m Zn^{2+} enthält, hat das Enzym bereits nach 10 bis 20 Sekunden seine volle Aktivität wieder erreicht. Selbst die Spuren Zink, die die Pufferlösung und das Substrat enthalten, reichen im Aktivitätstest aus, um nach kurzer Zeit, voll aktive Aminoacylase zu erhalten. Den gleichen Effekt wie Zink hat auch Kobalt. Auch mit Kobaltsalzen kann man das Enzym wieder aktivieren.

Von weiterem Interesse war es, zu untersuchen, welchen Einfluß das Metall auf die Aminoacylase hat. Als erstes zeigte sich, daß die Stabilität des Enzyms mit und ohne Metallion sich nicht ändert. Auch nach 5 Tagen, in denen eine Enzymlösung von ca. 1 mg/ml mit und ohne Phenanthrolin bei 4°C aufbewahrt wurde, war die Aktivität gleich.

Auch die immunochemischen Untersuchungen zeigen, daß das Enzym, welches sich in 1 mM Phenanthrolinlösung befand, das gleiche immunologische Verhalten zeigte wie die Kontrolle.

In Abbildung 46 diffundierten zwei Proben, die ausgiebig gegen Phenanthrolin dialysiert worden waren, und zwei Proben, die noch das für die Katalyse essentielle Metallion enthielten gegen die Antikörper. Der Agar enthielt zusätzlich 1 mM EDTA. Wie das Bild verdeutlicht, bildet die Immunpräzipitation ein einwandfreies Quadrat ohne Spornbildung.

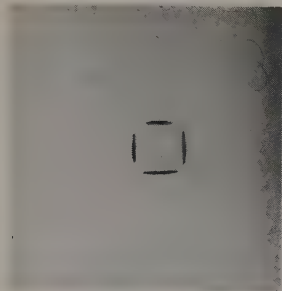


Abb. 46 Immunpräzipitation nach Ouchterlony. Der Agar enthält zusätzlich 1 mM EDTA.
a und c natives Enzym mit Metall
b und d gegen Phenanthrolin dialysiertes Enzym ohne Metall.

Das für die Katalyse essentielle Metall hat also keinen Einfluß auf den Zusammenhalt der Untereinheiten. Auch das Enzymmolekül, das gegen Phenanthrolin dialysiert worden war, zerfällt nicht in die Untereinheiten.

Da das Metallion für die Katalyse essentiell ist, wurde untersucht, welchen Einfluß es auf das aktive Zentrum der Aminoacylase hat. Hier boten sich als Parameter die Reaktivität und Zugänglichkeit der SH-Gruppen, die ebenfalls im aktiven Zentrum sitzen, an. Bestimmt man die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion der SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz, so beobachtet man folgenden Effekt: Bei dem Enzym, das gegen Phenanthrolin dialysiert worden war, reagierten die beiden SH-Gruppen der Untereinheiten erheblich schneller als die SH-Gruppen der Kontrolle (Abb. 47).

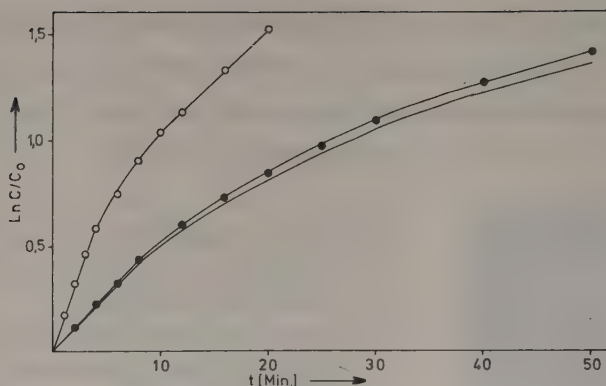


Abb. 47 Geschwindigkeit der Reaktion von Aminoacylase mit Ellman's Reagenz. Reaktionsbedingungen: 0,1 m TRIS pH 8,0 bei 25°C. Enzym: 1 mg/ml Ellman's Reagenz: $2,5 \times 10^{-4}$ m.

— Enzym mit Metall; ○—○ Enzym ohne Metall; ●—● Enzym ohne Metall und 10 mM DL-Norleucin.

Auch hier hemmt Norleucin, wie schon früher bei den SH-Untersuchungen gezeigt, die Erfassung beider SH-Gruppen pro Unter-einheit durch Ellman's Reagenz.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Inaktivierung der Aminoacylase durch Jodacetamid betrachtet. Auch hier wird das Enzym, das vorher gegen Phenanthrolindialysiert worden war, doppelt so schnell inaktiviert wie die Kontrolle.

Wie wir früher zeigen konnten, verliert das Enzym bei der Modifizierung von 4 Histidinresten seine Aktivität. Da Histidinreste oft an der Zinkbindung beteiligt sind [68, 69], wurde die Photooxidation der Aminoacylase, die vorher gegen Phenanthrolindialysiert worden war, durch-

geführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 48.

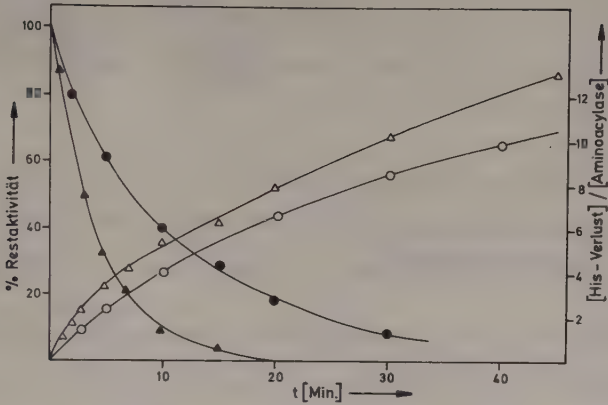


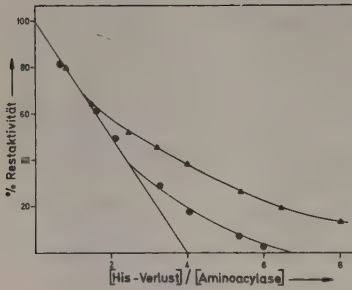
Abb. 48 Geschwindigkeit der Inaktivierung und Histidinmodifizierung der Aminoacylase durch Photooxidation bei pH 8,0.

△—△ Histidinverlust des Enzyms ohne Metall; ○—○ Histidinverlust des Enzyms mit Metall; ▲—▲ Restaktivität des Enzyms ohne Metall; ●—● Restaktivität des Enzyms mit Metall.

Das gegen Phenanthrolin dialysierte Enzym verliert viel schneller als die Kontrolle die Aktivität. Betrachtet man hingegen den Histidinverlust beider Proben, so zeigt sich, daß zu Beginn der Photooxidation die Histidinmodifizierung der gegen Phenanthrolin dialysierten Proben stärker steigt. Nach dieser Anfangsphase verlaufen beide Kurven jedoch fast parallel.

Eien noch besseren Überblick gibt Abbildung 49, bei der die Anzahl der modifizierten Histidinreste gegen die Aktivität aufgetragen wurde.

Abb. 49 Beziehung zwischen Restaktivität und Histidinmodifizierung. ●—● Enzym ohne Metall; ▲—▲ Enzym mit Metall



Extrapoliert man die Anfangsgerade, so kommt man bei beiden Kurven auf einen Histidinverlust von 4 Histidinresten pro Enzymmolekül, also 2 Histidinresten pro Untereinheit. Jedoch knickt die Kurve mit dem gegen Phenanthrolin dialysierten Enzym erst viel später ab; das heißt, bei dieser Probe werden erst bevorzugt die essentiellen Histidinreste erfaßt, bevor die anderen erfaßt werden.

Abbildungung 50 zeigt die Hitzestabilität der Aminoacylase.

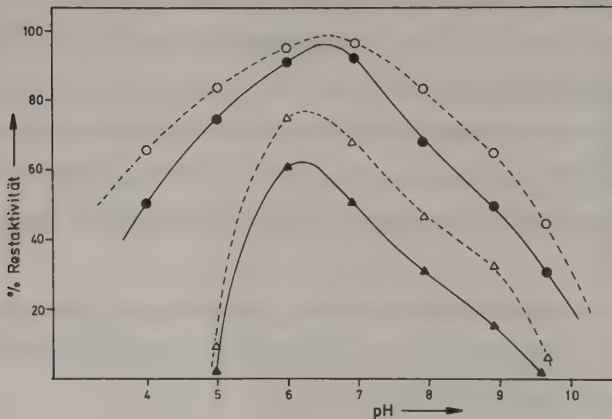


Abb. 50 Auftragung der Restaktivität gegen den pH-Wert bei der Hitzedenaturierung bei 50°C. ○—○ Enzym mit Metall nach 5 Minuten Inkubation; ▲—▲ Enzym mit Metall nach 10 Minuten Inkubation; ●—● Enzym ohne Metall nach 5 Minuten Inkubation; ▲—▲ Enzym ohne Metall nach 10 Minuten Inkubation.

Betrachtet man die Hitzestabilität der Aminoacylase, so zeigt sich, daß das Enzym, das noch das Metallion enthält, langsamer inaktiviert wird. Besonders deutlich wird dieses im sauren pH-Bereich.

4. DISKUSSION

4.1. Methodik

4.1.1. Analytische Probleme

Reinigung und Reinheitskontrolle

Die Reinigung der hier verwendeten Rohacylase konnte ohne größeren Zeitaufwand und größere Schwierigkeiten durchgeführt werden. Der wichtigste Schritt während der Anreicherung war die Reinigung durch die Gelchromatographie an Sephadex G 150. Bei diesem Schritt mußte es gelingen, gelbes Begleitprotein, das kurz vor der Aminoacylase eluiert wurde, vollständig abzutrennen, da weder die DEAE-Cellulose-Säule noch Kieselgur-Säulen oder Äthanol-fällung eine völlige Abtrennung des gelben Begleitproteins ermöglichten. Auch eine Endreinigung der Aminoacylase durch präparative Diskelektrophorese nach [70] ist nicht möglich. Schon BRUNS und SCHULZE [14] stellten fest, daß die Aminoacylase während der Elektrophorese bei der Wanderung im elektrischen Feld fast vollständig inaktiviert wurde. Parallel zu dieser Inaktivierung nimmt auch die Löslichkeit des Proteins stark ab. Dieses hatte wiederum zur Folge, daß die Apparatur verstopfte. Auch bei der Reinheitskontrolle durch analytische Diskelektrophorese erhält man eine relativ breite Bande. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, daß hier wieder während der Elektrophorese das Enzym anfängt, zu denaturieren. Durch die damit verbundene Konformationsänderung des Enzymproteins wandern die verschiedenen Spezies anschließend etwas schneller oder

langsamer im elektrischen Feld und verbreitern dadurch den Proteinpeak.

Bessere Ergebnisse brachten die SDS-Elektrophoresen. Da bei diesen Elektrophoresen auf jeden Fall die Tertiärstruktur zerstört wird, erhält man in diesem Fall eine scharfe Proteinbande. Eine zusätzliche Kontrolle waren die Immunelektrophoresen. Da die Kaninchen mit dem von uns gereinigten Enzym immunisiert worden waren, ist auch anzunehmen, daß gegen Fremdproteine, die möglicherweise noch in der Aminoacylasepräparation vorhanden waren, Antikörper erzeugt wurden. Die Immunelektrophorese zeigt jedoch nur einen einzigen Präzipitatbogen. Diffundiert das Antiserum gegen einen elektrophoretisch aufgetrennten Pufferextrakt aus Nieren-Acetonrockenpulver nach [71], so gibt es auch nur einen scharfen Bogen. Dieser Versuch schließt die Annahme aus, daß die Aminoacylase eine durch Mutation "verunglückte" Dipeptidase ist. Hinweise in dieser Richtung kamen von der hohen Aktivität der Aminoacylase bei der Spaltung von Dipeptiden. Verhindert wird die Dipeptidspaltung durch Substituenten an der freien Aminogruppe; auch die Anlagerung eines Protons im neutralen pH-Bereich reicht aus.

Aktivitätsbestimmung

Für die Aktivitätsbestimmung der Aminoacylase war es von großem Vorteil, daß N-Chloracetylalanin günstige spektrophotometrische Eigenschaften hat. Zum anderen wird es relativ schnell gespalten und die Spaltungsprodukte zeigen keine allzu starke Produkthemmung. Dieses wäre bei N-Chloracetylleucin der Fall. Die direkte photometrische Messung bringt große

Vorteile gegenüber den Aktivitätsbestimmungen, die GREENSTEIN und Mitarbeiter oder BRUNS und SCHULZE angewendet haben. Sie bestimmten in einem diskontinuierlichen Test die Menge der freigesetzten Aminosäure nach STEIN und MOORE [72]. Auch die von MITZ [30] angewendete Methode der kontinuierlichen Messung der Hydrolyse von N-Acetylmethionin bei 236 nm hat den Nachteil, daß der Extinktionskoeffizient zu niedrig ist. Die Hydrolyse der Dipeptide läßt sich gut bei 235 nm kontinuierlich verfolgen. Damit wird auch hier besonders die Bestimmung der K_1 - und K_m -Werte erleichtert.

Bestimmung des Modifizierungsgrades

Die heute in der Proteinchemie angewendeten gruppenspezifischen Reagenzien zeichnen sich zum größten Teil dadurch aus, daß sie leicht photometrisch meßbare farbige Verbindungen mit den betreffenden Aminosäuren geben. Die Extinktionskoeffizienten können durch die spezielle Umgebung der Chromophore im Protein verfälscht werden. Erheblich zuverlässigere Ergebnisse werden daher durch Aminosäureanalyse erhalten. Über unterschiedliche Ergebnisse aus photometrischen Bestimmungen und Aminosäureanalyse berichteten bereits einige Autoren [33, 34, 73]. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz ist darin zu suchen, daß manche Modifizierungsreagenzien zu verschiedenen Produkten führen können. So kann Histidin oder Tyrosin mit DHT sowohl zur Mono- als auch zur Disubstitution führen; TNM kann Tyrosine nitrieren oder zu Quervernetzungen führen. Dieses alles sind Faktoren, die die photometrischen Bestimmungen beeinflussen. Daher wurde in dieser Arbeit die Anzahl der modifizierten Aminosäurereste fast ausschließlich über die Amino-

säureanalyse bestimmt. Bei der Ermittlung des Modifizierungsgrades der Lysinreste durch TNBS ergab sich auch bei unseren Untersuchungen eine beträchtliche Differenz zwischen beiden Bestimmungsmethoden. Die Histidinmodifizierung mit Diäthylpyrocarbonat ist ein Beispiel dafür, wie weit sich die Werte für die Extinktionskoeffizienten in der Literatur unterscheiden können. Die Werte sind bereits in 3.11. angegeben.

K.H. RÖHM benutzte allerdings nicht Imidazol sondern ein Tripeptid Glycyl-L-histidyl-L-leucin für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten.

Bestimmung der SH-Gruppen

Für die Modifizierung der SH-Gruppen in Enzymen gibt es eine Vielzahl selektiver Reagenzien, da die SH-Gruppen normalerweise die weitaus reaktivsten nucleophilen Gruppen im Protein sind. Für die quantitative Bestimmung eignen sich hervorragend die Disulfidverbindungen Ellman's Reagenz und CPDS. Auch die Bestimmung der Anzahl aller Cysteine und Cystine im Protein nach Perameisensäureoxidation durch Aminosäureanalyse birgt keine Schwierigkeiten. Problematisch wird erst die SH-Bestimmung dann, wenn versucht wird, die durch Alkylierungsmittel frei zugänglichen SH-Gruppen über die Aminosäureanalyse zu bestimmen. Werden die SH-Gruppen mit Jodacetamid alkyliert, so cyclisiert das entstandene S-carboxymethylcystein bei der Hydrolyse zum Teil und damit wird zu wenig Cystein bestimmt [74]. Bessere Eigenschaften hat dagegen das Reaktionsprodukt der Cysteinreste mit Vinylpyridin [21]. Ellman's Reagenz kann nicht mehr angewendet werden, wenn auch die Anzahl der neu entstandenen SH-Gruppen nach der Ein-

wirkung eines Reduktionsmittels (DTE oder Mercaptoäthanol) angewendet wird. Diese Verbindungen enthalten selbst SH-Gruppen und reagieren mit Ellman's Reagenz. Entfernt man jedoch zuerst die überschüssigen Reduktionsmittel durch Gelfiltration oder Dialyse, so können die gespaltenen Disulfidbrücken wieder zum Teil oxidiert und geschlossen werden.

Bestimmung der restlichen Aminosäuren

Die kritischen Punkte bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins sind die Ermittlung der Anzahl der Cystein- und Cystin- und der Tryptophanreste. Ohne Tryptophanschutzmittel werden während der sauren Hydrolyse normalerweise die Tryptophanreste vollständig zerstört. Die alkalische Hydrolyse [75] hat meistens bis zu 30 % Tryptophanverlust zur Folge. Bei unseren Versuchen hat sich die Methode von SASAKI und MATSUBARA [19] außerordentlich bewährt, die auch von LÖFFLER und SCHNEIDER [76] mit großem Erfolg bei der Bestimmung der modifizierten Tryptophanreste angewendet wurde. Gerade hier zeichnet sich die Methode durch eine relativ geringe Fehlerbreite von etwa 5 % bei sorgfältiger Argonbegasung aus.

Die Modifizierung der Aminoacylase mit Tetranitromethan führt neben der Nitrierung der Tyrosinreste auch zu Quervernetzungen von Tyrosingruppen untereinander [65]. Es war daher von Interesse, auch die Anzahl der Quervernetzungen zu bestimmen. Da mit dem Aminosäureanalysator sowohl Nitrotyrosin als auch der Tyrosinverlust bestimmt werden konnte, bereitete dieses keine Schwierigkeiten.

4.1.2. Spezifität der Modifizierungsreagenzien

Zur Aufklärung des Mechanismus enzymatischer Reaktionen hat sich die chemische Modifizierung des Enzymproteins als wertvolles Hilfsmittel erwiesen. Die heute üblichen Modifizierungsreagenzien erfassen in ihrer Mehrzahl funktionelle Gruppen im Enzymmolekül unter so milden Bedingungen, daß die Tertiärstruktur weitgehend erhalten bleibt. Sie liefern daher direkt Informationen über die an der Katalyse beteiligten Gruppen. Modifizierungsreagenzien sollten daher möglichst spezifisch sein, also mit einer oder nur wenigen trifunktionellen Aminosäuren reagieren und wenn möglich photometrisch bestimmbar sein oder für die Aminosäureanalyse solche Produkte ergeben, die in der sauren Hydrolyse nicht wieder vollständig oder teilweise in die Ausgangsprodukte zerfallen. Zum anderen gelingt es oft durch Variationen des pH-Wertes und der Konzentrationen noch klare Aussagen bei solchen Reagenzien zu erhalten, die mit mehreren funktionellen Gruppen reagieren. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Proteinmodifizierung und die Spezifität der einzelnen Reagenzien geben MEANS und FEENEY [77].

Eine viel höhere Spezifität besitzen die " K_m -Inhibitoren", Inhibitoren, die in ihrer Struktur stark den Substraten oder Inhibitoren des entsprechenden Enzyms ähneln und dadurch im aktiven Zentrum gebunden werden. Durch die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms kommt die reaktive Gruppe des K_m -Inhibitors in eine für die Kupplung ideale Lage zu einer trifunktionellen Aminosäure des Enzyms. Dadurch wird die Reaktionswahrscheinlichkeit derart erhöht, daß nur an dieser Stelle eine Modifi-

zierungsreaktion eintritt und der K_m -Inhibitor kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird. Dieses war bei der Aminoacylase mit den Chlormethylketonen TPCK und TLCK der Fall, bei denen die essentielle ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes mit der Chlormethylgruppe des Reagenzes reagierte.

4.2. Eigenschaften des Enzymproteins

Wie die Hitzedenaturierung zeigt, verträgt die Aminoacylase kurzzeitiges Erhitzen auf 50°C und sogar auf 60°C. Auch BRUNS und SCHULZE [14] fanden, daß das Enzym bei kurzzeitigem Aktivitätstest seine maximale Umsatzgeschwindigkeit bei 60°C hat. BIRNBAUM und Mitarbeiter [8] stellten eine noch größere Hitzestabilität fest. Jedoch arbeiteten diese Autoren mit weitgehend ungereinigten Enzympräparationen. Bei einer Konzentration von mindestens 0,5 mg/ml ist die Aminoacylase in Lösung relativ stabil und verliert bei 4°C nur langsam ihre Aktivität (nach einer Woche noch ca. 70 % Restaktivität). Werden die Lösungen jedoch weiter verdünnt, so nimmt die Stabilität sehr schnell ab. Ebenso stabilisieren Puffer höherer Ionenstärke das Enzym. Dieses ist auch ein Grund dafür, daß die Gefriertrocknung die Aminoacylase zum größten Teil inaktiviert.

Die beiden Untereinheiten werden zwar, wie die SDS-Elektrophorese zeigt, nicht durch Disulfidbrücken zusammen gehalten, dennoch wurde unter normalen Bedingungen nie beobachtet, daß das Enzymmolekül in die Untereinheiten dissoziierte. Trägt man größere Aminoacylasemengen auf eine Sephadex G 150 Säule auf, so beobachtet man einen schwachen Peak, der dem Moleku-

largewicht des dimeren Aminoacylasemoleküls entspricht; doch wird auch hier keine Proteinbande, die dem Molekulargewicht der Untereinheit entspricht, gefunden.

Wird die Aminoacylase in Puffer mit einem pH-Wert unter pH 4,0 inkubiert, verliert sie umso schneller ihre Aktivität, je niedriger der pH-Wert wird. Allerdings beobachtet man zwischen pH 3,0 und pH 4,0 nach kurzzeitigem Inkubieren (1 bis 5 Minuten) und anschließende Überführung in einen Aktivitätstest bei pH 8,0, daß die Aktivität über eine längere Leckphase (etwa 2 bis 3 Minuten) zum Teil wiederkommt. Auch trübt sich die Enzymlösung bei kurzzeitigen Inkubieren bei niedrigen pH-Werten nicht. In diesem Fall wäre denkbar, daß die Aminoacylase anfängt, in die Untereinheiten zu dissoziieren. Noch nicht vollständig dissoziierte Untereinheiten könnten sich beim Aktivitätstest zum aktiven Dimeren zurückfalten. Die Stabilität des Enzymproteins nimmt unterhalb pH 5,0 stark ab. Daher war es auch nicht möglich, Modifizierungsreaktionen unterhalb pH 5,0 durchzuführen (z.B. die Kupplung von Tryptophanresten mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid [78]). Ebenso nimmt die Stabilität des Enzymproteins oberhalb pH 9,0 ab und es ist nicht mehr möglich, Enzym gegen einen Puffer oberhalb pH 9,5 zu dialysieren.

Die Angaben über das Molekulargewicht der Aminoacylase gehen in der Literatur weit auseinander. BRUNS und SCHULZE [14] bestimmten mit der Ultrazentrifuge einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20} = 5,5 \times 10^{-3}$ sec. Mit einer Diffusionskonstanten von $7,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \times \text{sec}^{-1}$ berechneten sie daraus ein Molekulargewicht von 76500. ORECHOWITSCH und Mitarbeiter [79] fanden dagegen ein Molekulargewicht von 119000. Zwischen die-

sen beiden Werten liegt das von uns über SDS-Elektrophorese und Gelchromatographie bestimmte Molekulargewicht von 86000. Beide Methoden stimmen dabei gut überein.

Wie viele Peptidasen [68, 69] enthält auch die Aminoacylase Zink. GREENSTEIN und Mitarbeiter [80] konnten zeigen, daß die Asche von Aminoacylase in ihren Hauptbestandteilen Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} und PO_4^{3-} enthält. Nach Inkubation mit Kobaltsalz und anschließender Dialyse fanden sie in der Asche als Hauptbestandteile nun Co^{2+} statt Zn^{2+} . Gleichzeitig zeigte die Aminoacylase eine etwas andere Substratspezifität. Die Autoren hatten das essentielle Zink gegen Kobalt ausgetauscht. Das Metallion wird vom Enzym sehr fest gebunden. Da Histidinreste oft an Metallbindungen beteiligt sind, und die Aminoacylase pro Untereinheit 2 essentielle Histidinreste hat, ist auch anzunehmen, daß zwei Bindungsstellen des Metallkomplexes von diesen Histidinresten besetzt werden. In dieses Bild passen die Ergebnisse der Photooxidation. Wird das Metall aus dem aktiven Zentrum entfernt, so werden die beiden Histidinreste durch die Photooxidation viel schneller angegriffen. Die Aktivität des Enzyms nimmt schneller ab als die Aktivität der Proben, in denen die Aminoacylase noch das Zinkion enthält. In die gleiche Richtung zeigen die Versuche, bei denen die SH-Gruppen modifiziert wurden. Das im aktiven Zentrum sitzende Zinkion schützt auch die SH-Gruppen vor der Modifizierung. Sicher ist auch dieses mit ein Grund für die Stabilität der SH-Gruppen gegenüber Oxidation. Jedoch hat das Zinkion keinen wesentlichen Einfluß auf die Konformation des aktiven Zentrums, da in dem Enzymmolekül, bei dem das Metall entfernt wurde, auch noch N-Tosylalanin und Norleucin genau den

selben hemmenden Einfluß bei der Modifizierung der SH-Gruppen zeigt wie die Kontrolle. Ebenso bleibt Jodacetamid ein sehr schlechtes Reagenz für die SH-Gruppen. Die Reaktion wird zwar doppelt so schnell, jedoch sollte Jodacetamid sehr viel schneller mit den SH-Gruppen reagieren, falls die Konformation des aktiven Zentrums durch Entfernung der Metallionen wesentlich verändert würde. Auch ohne Metall bleibt die unterschiedliche Reaktivität der beiden SH-Gruppen erhalten.

Die Photooxidation zeigt, daß sich auch die Konformation des gesamten Enzymmoleküls durch Entfernung des Metalls nicht ändert, da mit und ohne Metall die restlichen Histidinreste ungefähr gleich schnell erfaßt werden.

Ebenso zeigen die immunologischen Untersuchungen, daß das Enzym auch ohne Metall nicht in die Untereinheiten zerfällt.

Die etwas größere Hitzestabilität kann man darauf zurückführen, daß das Metallion im aktiven Zentrum über seine vier Liganden das Protein stabilisiert.

4.3. Substratspezifität der Aminoacylase

Schon GREENSTEIN und Mitarbeiter [81] und ebenfalls ÖTVOS und Mitarbeiter [12] fanden, daß die Aminoacylase bei pH 7,0 Dipeptide umsetzt. Allerdings war die Geschwindigkeit erheblich langsamer als mit N-Acylaminosäuren als Substrate. Betrachtet man die pH-Abhängigkeit der Dipeptidspaltung, so sieht man, pH-Optimum für Dipeptide bei pH 8,6 liegt. Wie wir oben sahen, wird nur der Anteil am Dipeptid gebunden und umgesetzt, dessen N-terminale Aminosäure deprotoniert, also negativ geladen ist. Das gleiche beobachtet man auch, wenn die

Hemmwirkung der Aminosäuren verglichen wird. Auch geladene Aminosäuren werden nicht gebunden und hemmen daher nicht die Katalyse. Wie die K_m -Werte der Dipeptide und die K_1 -Werte der Aminosäuren zeigen, werden die Werte um so kleiner, je hydrophober die N-terminale Aminosäure wird. Das Enzym besitzt demnach eine hydrophobe Tasche, in der die N-terminale Aminosäure oder die Acylkomponente gebunden werden. Selbst hydrophile OH-Gruppen reichen aus, die K_m -Werte und die Umsatzgeschwindigkeit drastisch zu verschlechtern. FONES und LEE [11] beobachteten, daß die Umsatzgeschwindigkeit beim Übergang von N-Acetylalanin zu N-Hydroxyacetylalanin um das 100 fache abnimmt; ebenso wird Thr-Ala nur sehr langsam umgesetzt. Vergleicht man die Umsatzgeschwindigkeit, so sieht man, daß sie bezogen auf die N-terminale Aminosäure von Threonin über Glycin nach Alanin steigt, jedoch beim Leucin wieder sehr stark abnimmt. Das kann man dadurch erklären, daß Leucin als hydrophobe Aminosäure zwar gut gebunden wird, nach der Spaltung die hydrophobe Tasche aber nur langsam verläßt und dadurch die Umsatzgeschwindigkeit stark drosselt. Vergleicht man die K_m - und k_{cat} -Werte, die ÖTVOS und Mitarbeiter [13] ermittelten unter diesem Gesichtspunkt, so ergibt sich das gleiche Ergebnis.

N-Acylaminosäure	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_m [mM]
Acetylnorleucin	400	3,3
Chloracetylnorleucin	860	1,5
Bromacetylnorleucin	290	1,4
Benzoylnorleucin	12,1	0,75
p-Chlorbenzoyl- norleucin	2,1	0,15

Auch hier wird der K_m -Wert umso kleiner, je hydrophober der Acylrest wird. Die k_{cat} -Werte steigen jedoch nur bis zum Chloracetylrest und fallen dann wieder ab.

FONES und LEE [11] stellten fest, daß N-Acylaminosäuren mit sehr großen N-Acylresten nicht mehr in die hydrophobe Tasche passen und nicht mehr umgesetzt werden; z.B. Trichloracetyl- und 2,4- Dichlorbenzoylreste. Auch bei unserem Vergleich der K_1 -Werte der Aminosäuren mit ihren Hydrophobizitätsparametern zeigt sich, daß die hydrophobe Tasche bestimmte sterische Anforderungen stellt. Gebunden werden nur L-Aminosäuren. Die geradkettigen Aminosäuren werden am besten gebunden, während bei den verzweigten mehr oder weniger starke sterische Hinderungen auftreten. Am deutlichsten wird dies bei Leucin, Isoleucin und Norleucin. Erstaunlich ist, daß Tryptophan neben Norleucin der stärkste kompetitive Inhibitor ist, obwohl Phenylalanin bereits eine starke sterische Hinderung bei der Bindung zeigt. Dieses deutet auf eine besonders starke Wechselwirkung der hydrophoben Tasche mit Tryptophan hin, in der nach unserer Auffassung auch das essentielle Tryptophan sitzt.

Die Ergebnisse von FU und BIRNBAUM [10] konnten bestätigt werden, daß eine freie Carboxylgruppe notwendig ist, damit das Substrat umgesetzt wird. Ebenso wie BRUNS und SCHULZE [14] konnten auch wir keine Transacylasereaktion feststellen.

4.4. Funktion und Reaktivität der Aminosäure: Cystein, Cystin, Tryptophan, Histidin, Lysin und Tyrcsin

4.4.1. Cystein- und Cystinreste

Für die Anordnung der SH-Gruppen im Enzym ergibt sich nach den bisherigen Untersuchungen folgendes Bild: Beide SH-Gruppen müssen sich im aktiven Zentrum befinden. Dieses zeigt der Versuch, bei dem das Enzym mit dem K_m -Inhibitor TPCK kovalent verknüpft wurde, denn in dem Enzym, das mit TPCK reagiert hat, kann mit Ellman's Reagenz keine der beiden SH-Gruppen mehr erfaßt werden. Die Beobachtung, daß auch bei vollständiger Inaktivierung der Aminoacylase mit TPCK noch 10 % der SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz erfaßt werden, läßt sich dadurch erklären, daß ein kleiner Teil des Enzymproteins denaturiert ist, keine Aktivität mehr besitzt und daher auch nicht mehr mit TPCK reagiert; die SH-Gruppen aber noch erfaßbar sind. Betrachtet man die Hemmwirkung von N-Tosylalanin auf die Geschwindigkeit der Reaktion der beiden SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz, so sieht man, daß die beiden SH-Gruppen im aktiven Zentrum sitzen müssen, da beide SH-Gruppen durch den kompetitiven Inhibitor N-Tosylalanin geschützt werden. Da ebenfalls Norleucin die Reaktionsgeschwindigkeit beider SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz stark hemmt, müssen beide SH-Gruppen sogar im hydrophoben Zentrum oder wenigstens dicht am hydrophoben Zentrum des Enzyms sitzen, da Norleucin eine hydrophobe Aminosäure ist, die sehr gut vom hydrophoben Bindungszentrum der Aminoacylase gebunden wird.

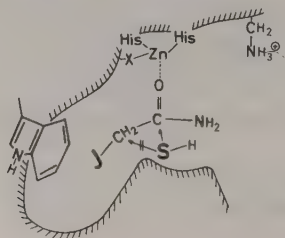
Von weiterem Interesse ist es, ob die SH-Gruppen sich vonein-

ander unterscheiden. Bestimmt man die Geschwindigkeitskonstanten für die SH-Reagenzien Ellman's Reagenz, CPDS und NEM, so beobachtet man, daß eine SH-Gruppe pro Untereinheit erheblich schneller mit diesen Verbindungen reagiert als die zweite. Dieser Effekt kann darauf beruhen, daß nach der Reaktion einer SH-Gruppe pro Untereinheit die zweite SH-Gruppe viel schlechter zugänglich für das Reagenzmolekül ist. An der ersten SH-Gruppe hängt jetzt schon ein recht großer Rest und behindert die Zugänglichkeit des zweiten. Eine andere Möglichkeit ist die, daß die eine SH-Gruppe an einer Stelle des aktiven Zentrums sitzt, die für das SH-Reagenz schwerer zugänglich ist oder sie hat wegen ihrer anderen Umgebung im Protein eine geringere Reaktivität gegenüber den SH-Reagenzien als die andere. Das Ergebnis zeigt, daß nach der Modifizierung der ersten SH-Gruppe durch NEM die zweite SH-Gruppe nur noch sehr langsam erfaßt wird. Die erste SH-Gruppe reagiert achtmal schneller als die andere. Bei den Disulfiden (Ellman's Reagenz und CPDS), die noch raumerfüllender als NEM sind, verhält sich jedoch der Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit nur wie 4 : 1. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die SH-Gruppen im Enzym in einer etwas anderen Umgebung mit verschiedener Reaktivität sitzen.

Inaktiviert man die Aminoacylase mit SH-Reagenzien und trägt die Restaktivität gegen den SH-Gehalt auf, so sieht man, daß nach der Modifizierung einer SH-Gruppe pro Untereinheit das Enzym keine Aktivität mehr hat. Dieses zeigt, daß für die Katalyse nur eine der beiden SH-Gruppen pro Untereinheit essentiell ist.

Überraschend ist die Stabilität der SH-Gruppen gegen Luftoxi-

dation. Das intakte Enzymmolekül übersteht sämtliche Reinigungsschritte und ist auch noch in Lösung einige Tage haltbar, ohne daß die SH-Gruppe wie bei anderen SH-Enzymen durch Mercaptoäthanol oder DTE wieder aktiviert werden müßte. Erstaunlich ist allerdings die Beobachtung, daß die SH-Reagenzien ganz verschieden schnell die SH-Gruppen erfassen. Schnell reagiert das Enzym mit aktivierten Doppelbindungen und mit Disulfiden. Die sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit mit α -Halogenacylen läßt sich folgendermaßen erklären: Diese Verbindungen, wie Jodacetamid, haben eine hydrophobe Jodmethylgruppe. Da die SH-Gruppen an oder in der hydrophoben Tasche des Enzyms sitzen, werden diese Verbindungen wenn sie sich der SH-Gruppe nähern sofort von dieser hydrophoben Tasche gebunden. Jodacetamid ist ein starker Hemmstoff der Aminoacylase. Soll Jodacetamid mit der SH-Gruppe reagieren, müßte eine nucleophile Substitution nach SN_2 stattfinden. Dieses bedeutet aber, daß die SH-Gruppe und Jodacetamid räumlich in eine ganz bestimmte Lage zueinander treten müssen, damit die Reaktion überhaupt stattfinden kann. Bevor jedoch die Reaktion stattfindet, wird das Jodacetamid in der hydrophoben Tasche gebunden und damit die Reaktionswahrscheinlichkeit mit der SH-Gruppe stark herabgesetzt. Die folgende Abbildung zeigt die unproduktive Bindung von Jodacetamid. Jodacetamid wirkt nicht alkylierend, da es "falsch" gebunden wird.



Zu dieser Theorie passen die Ergebnisse, daß durch andere Hemmstoffe wie N-Tosylalanin die Inaktivierungsgeschwindigkeit noch gesenkt wird. Diese erschweren zusätzlich den Zugang des SH-Reagenzes zur SH-Gruppe. Den umgekehrten Effekt zeigt Harnstoff, der die Reaktionsgeschwindigkeit der SH-Gruppen erhöht.

Als letztes wurde der pK-Wert für die zuerst reagierenden SH-Gruppen bestimmt. Hier machten besonders folgende Tatsachen Schwierigkeiten. Erstens ist die Reaktivität der SH-Gruppen mit NEM sehr hoch. Man muß daher bei 0°C messen, um die Reaktion nach erster Ordnung aufnehmen zu können. Zum andern kann man die Reaktion nur sehr schwer abstoppen, da hoher Cysteinüberschuß sofort die essentielle Disulfidbrücke angreift. Daher wurde mit einem 2,5 fachen Überschuß an Cystein (bezogen auf NEM) die Reaktion abgestoppt und sofort noch zusätzlich der pH-Wert durch Zusatz von Natriumacetatpuffer erniedrigt, um nochmals die Reaktionsgeschwindigkeit stark zu verringern. Anschließend wurden die niedermolekularen Bestandteile sofort abgetrennt. Bei dem Versuch ergab sich ein pK-Wert von $pK = 8,35$, also ein ganz "normaler" pK-Wert für eine SH-Gruppe des Cysteins.

4.4.2. Tryptophanreste

Bei der Substratspezifität der Aminoacylase wurde bereits erwähnt, daß hydrophobe Acylgruppen oder hydrophobe N-terminale Aminosäuren der Dipeptide besonders gut von der Aminoacylase gebunden werden. Tryptophan zeigt daher auch die stärkste Hemmwirkung auf die Katalyse. Die wichtigste Funktion von

Tryptophanresten im Enzym besteht einmal im Zusammenhalt des Enzymproteins durch hydrophobe Regionen und zum andern in der Bindung des Substrates [82]. Die hydrophobe Region des Enzyms, in der Tryptophanreste sitzen, bindet die hydrophobe Gruppe des Substrates. Werden bei der Aminoacylase zwei Tryptophanreste pro Enzymmolekül modifiziert, so verliert sie ihre Aktivität. Die immunochemischen Untersuchungen zeigen, daß durch die Tryptophanmodifizierung kein wesentlicher Einfluß auf das gesamte Enzymprotein ausgeübt wird. Der Aktivitätsverlust kommt nicht daher, daß die Aminoacylase in ihre Untereinheiten zerfällt. Ebenso bildet das modifizierte Enzym mit den Antikörpern an der gleichen Stelle Immunpräzipitate.

Das für die Tryptophanreste selektivste Modifizierungsreagenz war DHT. Dieses reagierte schon bei sehr geringen molaren Überschüssen mit dem für die Substratbindung essentiellen Tryptophanresten. Bevor die Lysinreste überhaupt anfangen, mit DHT zu kuppeln, haben bereits drei Tryptophanreste reagiert und das Enzym besitzt keine Aktivität mehr. Ursprünglich wurde DHT als Histidinreagenz [34] eingeführt. Bei der Aminoacylase reagieren jedoch die Histidinreste erst mit einem so hohen molaren Überschuß, bei dem schon fast alle Tryptophanreste modifiziert worden sind. Zum andern verhält sich die pH-Abhängigkeit der Tryptophanmodifizierung mit DHT, wie auch LÖFFLER und SCHNEIDER [77] beobachteten anders als bei anderen reaktiven Aminosäuren. Die besten Kupplungsausbeuten beobachteten wir bei pH 5,5; nach höheren pH-Werten fiel die Kupplungsausbeute ab. Mit Hilfe der pH-Abhängigkeit konnte auch klar bewiesen werden, daß der Aktivitätsverlust nicht

von einer Modifizierung der essentiellen SH-Gruppen durch DHT herrührt. Die Ergebnisse zeigen, daß keine lineare Beziehung zwischen Aktivitätsverlust und Erfassung der SH-Gruppen besteht. Zum andern steigt die Reaktivität der SH-Gruppen bei höheren pH-Werten. Die Inaktivierung der Aminoacylase ist jedoch bei pH 5,5 viel stärker als bei pH 8,5. Einen geringen Einfluß hat jedoch die SH-Modifizierung. So schneidet die extrapolierte Kurve in Abbildung 22 nicht bei einem Tryptophanverlust von 2 sondern etwas früher die Abzissenachse, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine geringe Anzahl essentieller SH-Gruppen erfaßt worden ist.

Inhibitoren der Aminoacylase, auch das kovalent gebundene TPCK, schützen das Enzym nicht vor dem Angriff durch DHT. Nach STEVENS [83] reagieren Diazoniumsalze mit Tryptophanresten zu einem in 2.6.3. aufgezeichneten Produkt, bei dem die Diazokomponente in 3-Stellung addiert wird. Der Indolring reagiert dabei als Enamin. Bei der Reaktion verschwindet die Doppelbindung und in 2-Stellung wird eine OH-Gruppe angelagert. Das entstandene Zwischenprodukt zerfällt sofort unter Ringspaltung und wird dann bei der sauren Hydrolyse weiter abgebaut.

Da DHT eine negativ geladene sehr hydrophile Substanz ist, ist kaum anzunehmen, daß das in der hydrophoben Region sitzende Tryptophanmolekül, in der auch die Inhibitoren sitzen, angegriffen wird. Vielmehr muß man annehmen, daß der Tryptophanrest von der anderen Seite der Proteinkette her angegriffen wird. Durch die Zerstörung des Indolrings und Addition von hydrophilen Gruppen wird dann die native Anordnung des akti-

ven Zentrums gestört und das Enzym inaktiviert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß auch NBS die Tryptophanreste der Aminoacylase modifiziert. Jedoch bringt die Oxidation mit NBS einige Nachteile gegenüber DHT. Da NBS auch die Proteinketten angreift und sie spaltet [61, 62], fängt die Aminoacylase bereits bei niedrigen Überschüssen an, zu denaturieren. Durch die Trübung der Enzymlösung sind keine photometrischen Messungen mehr möglich. Damit entfällt zum einen die photometrische Bestimmung der Modifizierung und zum andern die Bestimmung der oxidierten SH-Gruppen mit Ellman's Reagenz bei höheren Reagenzüberschüssen. Auch hier werden, wie bei DHT, vor den SH-Gruppen die essentiellen Tryptophanreste oxidiert. Durch DHT werden jedoch die beiden essentiellen Tryptophanreste weitaus selektiver erfaßt. Die Kurve der Tryptophanoxidation mit steigenden NBS-Überschüssen zeigt einen deutlichen biphasischen Verlauf. Die beiden essentiellen Tryptophanreste werden am Anfang relativ langsam erfaßt; bei höheren molaren Überschüssen über 50 molar steigt die Erfassung der restlichen stärker an.

4.4.3. Tyrosinreste

Die Reaktivität der Tyrosinreste der Aminoacylase wurde gegenüber vier verschiedenen Modifizierungsreagenzien getestet. Allerdings gibt nur die Acetylierung der phenolischen OH-Gruppen Auskunft über den Einfluß der Tyrosinreste auf die Aktivität des Enzyms.

Mit DHT reagieren die Tyrosinreste nur sehr langsam. Bei einem 100 fachen molaren Überschuß ist erst ein Tyrosinrest erfaßt

worden, dagegen bereits 7 Lysinreste und 8 Tryptophanreste. Ähnlich verhält sich die Oxidation mit NBS. Hier fangen bei einem 100 fachen molaren Überschuß Tyrosin- und Histidinreste an, mit dem Reagenz zu reagieren. Doch sind bereits etwa 8 Tryptophanreste erfaßt worden.

Das einzige Experiment, bei dem die Modifizierung der Tyrosinreste mit der Restaktivität verglichen werden kann, ist die Acetylierung der phenolischen OH-Gruppen der Tyrosinreste mit NAI. Es fällt bei dem Versuch auf, daß sehr hohe Reagenzüberschüsse gewählt werden müssen, um überhaupt eine Reaktion zu erhalten. Bei so hohen Reagenzüberschüssen werden auch Lysinreste erfaßt. Diese können jedoch nicht photometrisch erfaßt werden und mußten daher über den Umweg der Kupplung des Enzyms mit DHT bestimmt werden. Erfreulich ist bei diesem Versuch die gute Übereinstimmung der photometrischen und über Aminosäureanalyse ermittelten Ergebnisse bei der Tyrosinacetylierung. Das Ergebnis zeigt erstens, daß die Inaktivierung voll auf die Acetylierung der Lysinreste zurückzuführen ist und zweitens, daß die 20 Tyrosinreste der Aminoacylase nur sehr schwer acetylierbar sind.

Bei der Modifizierung mit TNM werden am Anfang etwa gleich schnell Tyrosin- und Tryptophanreste erfaßt. Erstaunlich ist, daß die Bildung von Nitrotyrosinen erst bei einem 30 fachen molaren Überschuß anfängt, einer Konzentration an TNM, bei der bereits ein Verlust von 4 Tyrosinresten zu beobachten ist. Die wichtigste Nebenreaktion von TNM besteht in der radikalischen Quervernetzung benachbarter Tyrosinreste untereinander [64, 65]. Bei der Aminoacylase werden offensichtlich bei nie-

drigen Reagenzkonzentrationen zwei Quervernetzungen gebildet. Anschließend werden schnell drei Tyrosinreste nitriert. Im weiteren Verlauf steigt die Anzahl der Nitrotyrosine nur sehr langsam an und es bilden sich wieder Quervernetzungen. Dieser Befund paßt gut zu den Ergebnissen der Modifizierung mit NAI. Offenbar befindet sich der größte Teil der Tyrosinreste im Innern des Enzymmoleküls. Wie die hohe Quervernetzung zeigt, müssen mehrere Tyrosinreste einander eng benachbart sein. Daher wurde auch bei hoher Tyrosinmodifizierung und hoher Quervernetzung in der SDS-Elektrophorese nur eine sehr geringe Zunahme des Molpeaks beobachtet. Selbst die beiden Untereinheiten werden kaum durch Quervernetzungen verknüpft. Betrachtet man die pH-Abhängigkeit, so sieht man, daß die Nitrotyrosinbildung mit steigendem pH-Wert bis pH 9,0 zunimmt und nach pH 9,0 wieder abnimmt. Ähnlich verhält sich auch die Quervernetzung. Dieses kann man vielleicht darauf zurückführen, daß das Enzym bei pH 9,5 schon recht labil ist und anfängt zu denaturieren. Auch zeigt die Aminocyclase bei pH 9,5 fast keine Aktivität mehr. Offensichtlich fängt hier die Tertiärstruktur des Enzyms an, sich zu ändern. Dieses hat wieder Einfluß auf die Umgebung der einzelnen Tyrosinreste auch auf die Stellung der Tyrosinreste zueinander. Eine Beziehung zwischen Restaktivität und Nitrierung der Tyrosinreste bzw. Quervernetzung kann jedoch nicht aufgestellt werden, da TNM sehr schnell die essentiellen SH-Gruppen oxidiert. Wie schon früher ausgeführt wurde, ist ein reversibler Schutz der SH-Gruppen z.B. über ein Sulfenyl-Thiosulfat-Derivat nicht möglich.

4.4.4. Lysinreste

Für die Modifizierung der Lysinreste bieten sich verschiedene relativ selektive Reagenzien an. So wird ein Teil der Lysingruppen der Aminoacylase schnell durch Essigsäureanhydrid acetyliert. Da das Reaktionsprodukt weder spektroskopisch bestimmbar ist noch die saure Hydrolyse übersteht, ist man in diesem Fall gezwungen, radioaktiv zu arbeiten. Hingegen läßt sich das Reaktionsprodukt mit TNBS leicht photometrisch bestimmen. Wegen der recht großen Differenz bei den in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten zwischen 0,9 bis $1,45 \times 10^4 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [41, 84], wurden die Ergebnisse über Aminosäureanalysen kontrolliert. Die Ergebnisse zeigen, daß nach der Erfassung von ungefähr 12 Lysinresten die Aminoacylase ihre Aktivität verloren hat. Viel selektiver sind hingegen die K_m -Inhibitoren TPCK und TLCK. Die hydrophobe Tosylgruppe dieser Verbindungen wird in der hydrophoben Tasche des Enzyms gebunden und die Chlormethylgruppe befindet sich dann in einer für die Reaktion günstigen Stellung zur ϵ -Aminogruppe eines essentiellen Lysinrestes. Wie stark durch diese räumliche Fixierung die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird, zeigt der Versuch, in wässrigem Carbonatpuffer pH 9,5 N α -Acetyllysin mit TPCK zu kuppeln. Bei diesem Versuch konnte auf dem Chromatogramm kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

Das Chlormethylketon wird im aktiven Zentrum gebunden. Dieses verdeutlicht eindeutig der Versuch, bei dem zusätzlich der kompetitive Hemmstoff DL-Norleucin zugegeben wurde. Steigende Norleucinkonzentrationen konkurrieren mit dem Chlormethylketon um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum

und drängen dadurch die Inaktivierung durch TPCK stark zurück. Der direkte Nachweis, daß Lysinreste mit TPCK reagieren ist jedoch schwierig. Da das Reaktionsprodukt nicht vorhanden ist, mußte der Lysinverlust (max. 2 von 34 Lysinresten) bestimmt werden. Dadurch streuen die Punkte etwas stärker, jedoch zeigen sie deutlich in Richtung der erwarteten Ergebnisse. Diese wurden auch aus der pH-Abhängigkeit der Inaktivierung der Aminoacylase durch TPCK unterstützt; hier wurde ein pK-Wert von 10,2 also ein für die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes ganz "normaler" pK-Wert ermittelt.

Einfacher war die Bestimmung des reagierenden Histidinrestes für SCHOELLMANN und SHAW [85], die zuerst TPCK zur irreversiblen Blockierung des Chymotrypsins benutzten, da Chymotrypsin nur wenige Histidinreste enthält. Auch WILCOX und Mitarbeiter [86], die Chlormethylketonpeptide benutzten, verwendeten die Aminosäureanalyse zur Bestimmung der Kupplungsausbeute. Auf gleiche Weise verfahren auch GERTLER [87] bei der Protease B und THOMPSON und BLOUT [88] bei der Elastase.

4.4.5. Histidinreste

Die Aminoacylase braucht für ihre enzymatische Aktivität eine intakte SH-Gruppe und Metallionen. Bei vielen Enzymen wird eine Beteiligung des Histidinrestes als kooperativer Partner des Cysteins an der Enzymkatalyse gefordert oder Histidinreste sind bei anderen Enzymen wichtige Bindungsstellen für das komplex gebundene Metallion, besonders Zinkion. Wie die Photooxidation zeigt, verliert die Aminoacylase nach der Modifizierung von 4 Histidinresten, also 2 Histidinresten pro

Untereinheit, ihre Aktivität. Die Photooxidation ist ein typischer Fall dafür, daß man durch Variation des pH-Wertes eindeutig entscheiden kann, ob die ebenfalls erfaßten Tryptophanreste oder Histidinreste für den Aktivitätsverlust verantwortlich sind. Bei pH 7,5 sind nach 20 minütiger Belichtungszeit sowohl 2 Tryptophanreste als auch 4 Histidinreste erfaßt worden. Tryptophan zeigt jedoch praktisch keine pH-Abhängigkeit bei der Photooxidation, während die Histidinmodifizierung mit steigendem pH-Wert zunimmt, parallel dazu nimmt die Inaktivierung zu. Wie schon in 4.2. ausgeführt wurde, werden in der Aminoacylase die Histidinreste offensichtlich zur Bindung des essentiellen Zinks im aktiven Zentrum benötigt. Wurden die beiden Histidinreste zerstört, kann das Zink nicht mehr gebunden werden und das Enzym verliert seine Aktivität. Dieses Ergebnis wird auch durch die Modifizierung durch DEP unterstrichen. Wird ein Stickstoffatom des Imidazolrings des Histidinrestes durch N-Äthoxyformylgruppe substituiert, so kann der Histidinrest keine Bindung mehr zum Metall bilden und die Aminoacylase verliert ihre Aktivität. Das DEP reagiert im Fall der Aminoacylase sehr selektiv mit den 4 essentiellen Histidinresten.

4.5. Vorschlag für den Mechanismus der enzymatischen Katalyse

Zur Substratbindung der N-Acylaminosäuren oder Dipeptide sind zwei Stellen besonders wichtig. Die Acylgruppe oder die N-terminale Aminosäure werden durch hydrophobe Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche des Enzyms fixiert. Die für die Spaltung des Substrates essentielle Carboxylgruppe wird in der

positiv geladenen Aminogruppe eines Lysinrestes über elektrostatische Wechselwirkungen gebunden. Die dritte Bindungsstelle des Substrates kommt wahrscheinlich durch die Bindung des Carbonylsauerstoffatoms durch das Zinkion zustande. Da die Aminogruppe einen pK-Wert von 10,2 hat und somit im Aktivitätsbereich der Aminoacylase immer positiv geladen ist, ist die Bindung des Substrates pH-unabhängig. Dieses zeigt sich eindeutig in den K_m -Werten, die vom pH unabhängig sind. Die Katalyse wird verhindert, wenn die für die Substratbindung essentielle Lysingruppe oder der essentielle Tryptophanrest, der sehr wahrscheinlich in der hydrophoben Tasche sitzt, modifiziert werden.

Als nächstes zeigen die Versuche, daß die Aminoacylase, wie fast alle Peptidasen, essentielles Zink enthält. Da sich nach der Entfernung des Zinks an der Tertiärstruktur des Enzyms nichts ändert, auch das aktive Zentrum seine native Konformation beibehält, ist anzunehmen, daß das Zink direkt an der Katalyse teilnimmt. Das Zink schützt 2 Histidinreste pro Untereinheit vor der Modifizierung, die ebenfalls essentiell für die Katalyse sind. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß diese beiden Histidinreste wichtige Komplexliganden für das Zink sind und das Zink, wie schon in anderen Modellen [68, 69, 89], als Supersäure die Carbonylfunktion als Komplexligand bindet und gleichzeitig stark polarisiert. Das Carbonylkohlenstoffatom kann nun von der essentiellen SH-Gruppe angegriffen werden; ob direkt oder über eine Aktivierung des Wassers, bleibt dahingestellt. Somit ist es auch ohne Bedeutung, daß keine Hydroxamatbildung beobachtet werden konnte,

da wie ÖTVOS und Mitarbeiter [13] zeigen konnten, bei der Spaltung auf jeden Fall die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist und das Acylenzym in Gegenwart des Zinkkomplexes sofort gespalten wird.

Wie die Untersuchungen zeigen, ist kein Tyrosinrest an der Katalyse beteiligt. Auch mit Phenylmethansulfonylfluorid konnte kein reaktiver Serinrest erfaßt werden. Es liegt daher nahe, die SH-Gruppe als wichtigen Protonendonator für die entstehende Aminogruppe zu betrachten. Dieses gewinnt dadurch Bedeutung, weil die SH-Gruppen am Rand der hydrophoben Region sitzen. Die SH-Gruppe übernimmt hier nach unserer Meinung die Funktion mit, die z.B. bei der Carboxypeptidase [90] der Tyrosinrest übernimmt. Mit dieser Annahme kann man auch den Abfall der Aktivität zwischen pH 8,0 und pH 9,5 erklären. Das pH-Optimum der Aminoacylase liegt etwa 0,3 pH-Einheiten vor dem pK-Wert der SH-Gruppe. Wird der pH-Wert ins Basische verschoben, so wird die SH-Gruppe immer stärker deprotoniert. Dieses hat zur Folge, daß die SH-Gruppe nicht mehr ihre Funktion als Protonendonator erfüllen kann.

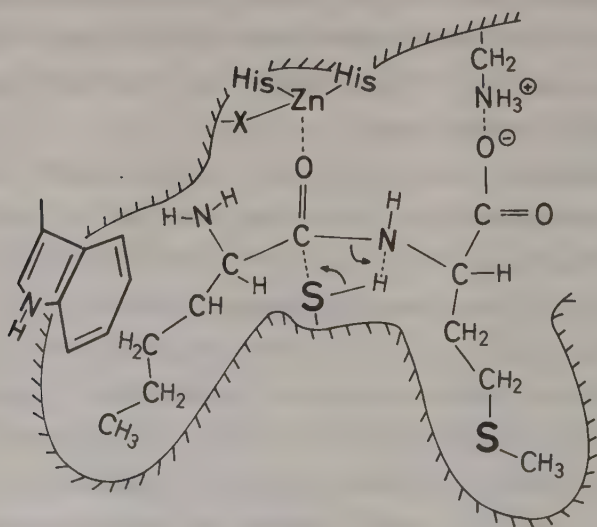
Der Aktivitätsabfall zwischen pH 8,0 und pH 6,0 könnte auf einer Veränderung eines Komplexliganden des Zinks beruhen. Durch diesen Einfluß verliert das Zink seinen optimalen katalytischen Einfluß. Daher werden labilere Bindungen z.B. Chloracetylmilchsäure bei pH 7,5 optimal gespalten, während Peptidbindungen ihr Optimum bei pH 8,2 haben. Dazwischen liegen aktivierte Peptidbindungen z.B. N-Chloracetylalanin. Die pH-Abhängigkeit setzt sich demnach aus zwei gegenläufigen Einflüssen zusammen. Zum einen verliert das komplexgebundene

Zink nach niedrigen pH-Werten hin seine optimale katalytische Funktion und zum andern verliert nach hohen pH-Werten hin die SH-Gruppe ihr für die Katalyse ebenfalls essentielles Proton.

Durch die räumliche Nähe der SH-Gruppen zum Zinkkomplex übt dieser eine Schützende Funktion auf die SH-Gruppen aus. Dieses ist sicher mit ein Grund für die erstaunliche Oxidationsstabilität der SH-Gruppen.

Acylgruppen, die sehr gut von der hydrophoben Region gebunden werden, verlangsamen die Geschwindigkeit, weil die Acylkomponente nach der Spaltung nur sehr langsam das aktive Zentrum verläßt und danach erst die Bindung eines neuen Substratmoleküls möglich ist.

Diese Vorstellungen liegen dem nachfolgend formulierten Vorschlag für den Mechanismus der Aminoacylase-Katalyse zugrunde.



5. ZUSAMMENFASSUNG

Proteinchemische Untersuchungen und chemische Modifizierung der Aminosäuren Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Cystin und deren Auswirkung auf die Aktivität sowie die kinetischen Eigenschaften der Aminoacylase führen zu folgenden Erkenntnissen über das Enzym und die Katalyse.

1. Durch Gel-Chromatographie an Sephadex G 150 und DEAE-Cellulose-Chromatographie wird eine nach Ausweis der Disk-Elektrophorese, SDS-Elektrophorese und Immunelektrophorese einheitliche Aminoacylase erhalten. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde über Gel-Chromatographie und SDS-Elektrophorese zu ca. 86000 bestimmt. Wie die SDS-Elektrophorese zeigt, besteht die Aminoacylase aus zwei identischen Untereinheiten vom Molekulargewicht 43000. Beide Untereinheiten sind nicht über Disulfidbrücken verknüpft. Die Aminosäureanalyse des Enzyms zeigt keine unerwarteten Besonderheiten.

2. Die Aminoacylase enthält pro Untereinheit 2 SH-Gruppen mit unterschiedlicher Reaktivität, die beide im aktiven Zentrum sitzen. Modifizierung der schneller reagierenden SH-Gruppen inaktiviert das Enzym. Ebenfalls enthält die Aminoacylase 2 Disulfidbrücken pro Untereinheit. Eine ist leicht reduzierbar und essentiell für die Aktivität; die zweite nur durch Perameisensäureoxidation erfaßbar.

3. Die Substratspezifität zeigt, daß die Aminoacylase auch um pH 8,5 Dipeptide spaltet. Die pH-Abhängigkeit der K_m - und K_i -Werte zeigt, daß nur Dipeptide und Aminosäuren mit deprotonierter Aminogruppe vom Enzym gebunden werden. Die K_m -Werte sind um so niedriger, je hydrophober die N-terminale Amino-

säure ist. Hydrophobe deprotonierte Aminosäuren sind starke kompetitive Inhibitoren des Enzyms. Aus diesem Befund ist zu schließen, daß die Bindung der N-terminalen Aminosäuren der Dipeptide an einem streng hydrophoben Zentrum erfolgt.

4. In diesem hydrophoben Zentrum ist nach unserer Meinung ein essentieller Tryptophanrest vorhanden, der sehr selektiv durch DHT bei pH 5,5 modifiziert wird, ohne daß Lysin-, Histidin- und Tyrosinreste erfaßt werden. Die Oxidation mit NBS ergibt ein ähnliches Ergebnis.

5. Durch die K_m -Inhibitoren TPCK und TLCK werden 2 essentielle Lysinreste der Aminoacylase sehr selektiv unter Inaktivierung des Enzyms alkyliert.

6. Modifizierung der Histidinreste des Enzyms mit DEP und durch Photooxidation lassen folgende Schlüsse zu: Pro Untereinheit sind zwei Histidinreste essentiell als Komplexliganden für das Zink; sie helfen dieses in der für die Katalyse idealen Lage zu halten.

7. Für die Substratbindung läßt sich aus den erhaltenen Ergebnissen folgendes Modell aufstellen: Die Acylgruppe einer Acyl-aminosäure oder die deprotonierte N-terminale Aminosäure eines Dipeptids werden durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Die protonierte ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes bindet über elektrostatische Wechselwirkungen die freie Carboxylgruppe des Substrats und der Carbonylsauerstoff wird zu einem Komplexliganden des Zinkkomplexes. An der Bindung sind, wie die pH-Abhängigkeit der K_m - und K_i -Werte zeigt, keine zwischen pH 6,5 und pH 9,5 dissozzierende Gruppen beteiligt.

8. Für die enzymatische Spaltung der Amidbindung sind eine SH-Gruppe und der Metallkomplex von Bedeutung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schmiedeberg, O. (1881) Naunyn - Schmiedebergs Archiv. Exp. Pathol. Pharmacol. 13, 379 - 392
2. Fodor, P.J., Price, V.E. & Greenstein, J.P. (1949) J. Biol. Chem. 178, 503 - 509
3. Price, V.E., Gilbert, J.B. & Greenstein, J.P. (1949) J. Biol. Chem. 179, 1169 - 1174
4. Greenstein, J.P., Gilbert, J.B. & Fodor, P.J. (1950) J. Biol. Chem. 182, 451 - 456
5. Levintow, L. & Greenstein, J.P. (1951) J. Biol. Chem. 188, 643 - 646
6. Greenstein, J.P., Levintow, L., Baker, C.G. & White, J. (1951) J. Biol. Chem. 188, 647 - 663
7. Hamer, D. & Greenstein, J.P. (1951) J. Biol. Chem. 193, 81 - 89
8. Birnbaum, S.M., Levintow, L., Kingsley, R.B. & Greenstein, J.P. (1952). J. Biol. Chem. 194, 455 - 470
9. Hanson, H.T., Hermann, P. & Blech, W. (1959) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 315, 201 - 207
10. Fu, S, & Birnbaum, S.M. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 918 - 920
11. Fones, W.S. & Lee, M. (1953) J. Biol. Chem. 201, 847 - 856
12. Moravcsik, E., Tüdös, H., Telegdy, J., Kömives, K. & Ötvös, L. (1974) 9th FEBS Meeting, Budapest, Abstracts S. 91

13. Ötvös, L., Moravcsik, E. & Mady, G. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1056 - 1063
14. Bruns, F.H. & Schulze, C. (1962)
Biochem. Z. 336, 162 - 181
15. Bloemendal, H. zitiert in: Maurer, H.R., Disk-
elektrophoresen S. 30 - 36, de Gruyter, Berlin (1968)
16. Bailey, J.L.
Techniques in Protein Chemistry, Elsevier, Amsterdam,
London, New York (1967)
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. &
Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
18. Bedienungsanleitung zum Multichrom B Flüssigkeits-
Säulenchromatograph, Beckman Instruments, München
19. Matsubara, H. & Sasaki, R.M. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175 - 178
20. Hirs, C.H.W. (1956) J. Biol. Chem. 219, 611 - 616
21. Friedman, M., Krull, L.H. & Lavins, J.F. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 3868 - 3871
22. Maurer, H.R. (1968)
Disk-Elektrophorese S. 42 - 43, de Gruyter, Berlin
23. Clausen, J. (1969) in Immunochemical techniques for
the identification and estimation of macromolecules
North-Holland Publishing Company - Amsterdam - London
24. Ouchterlony, Ö. zitiert in : Laboratoriumsblätter der
Behringwerke 3 (1971)
25. Michaelis, L. (1931) Biochem. Z. 234, 139 - 141
26. Laboratoriumsblätter der Behringwerke 3 (1971) S. 18 - 19

27. Weber, K. & Osborn, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412
28. Andrews, P. (1965) Biochem. J. 96, 595 - 606
29. Schmitt, A. & Siebert, G. (1961)
Biochem. Z. 334, 96 - 107
30. Mitz, M.A. & Schlueter, R.J. (1958)
Biochim. Biophys. Acta 27, 168 - 172
31. Ellman, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77
32. Grasetti, D.R., Murray, J.F. & Ruan, H.T. (1969)
Biochem. Pharm. 18, 603 - 611
33. Horinishi, H., Hachamori, Y., Kurihara, K. & Shihata, K.
(1964) Biochim. Biophys. Acta 86, 477 - 489
34. Sokolovsky, M. & Vallee, B.L. (1966)
Biochemistry 5, 3574 - 3581
35. Spande, T.F. & Witkop, B. (1967)
Methods Enzymol. 11, 498 - 506
36. Sokolovsky, M., Riordan, J.F. & Vallee, B.L. (1966)
Biochemistry 5, 3582 - 3589
37. Morihara, K. & Nagami, K. (1969)
J. Biochem. 65, 321 - 325
38. Riordan, J.F. & Vallee, B.L. (1963)
Biochemistry 2, 1460 - 1468
39. Riordan, J.F., Wacker, W.E.C. & Vallee, B.L. (1965)
Biochemistry 4, 1758 - 1765
40. Komatsu, S.K. & Feeney, R.E. (1967)
Biochemistry 6, 1136 - 1141
41. Habeeb, A.F.S.A. (1966) Anal. Biochem. 14, 328 - 336

42. Weil, L., Gordon, W.G. & Buchert, A.R. (1951)
Arch. Biochem. Biophys. 34, 1 - 8
43. Tomita, M., Irir, M. & Ukita, T. (1969)
Biochemistry 8, 5149 - 5160
44. Ray, W.J. (1967) Methods Enzymol. 11, 490 - 497
45. Weil, L. (1965) Arch. Biochem. Biophys. 110, 57 - 68
46. Rosen, C.G. & Fodorcsak, I. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 130, 401 - 405
47. Mühlrad, A., Hegyi, G. & Horanyi, M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 181, 184 - 190
48. Melchior, W.B. & Farney, D. (1970)
Biochemistry 9, 251 - 258
49. Bedienungsanleitung für die Elektrofokussiersäule
LKB-Produkte, Stockholm
50. Lindley, H. (1960) Biochem. J. 74, 577 - 584
51. Lindley, H. (1962) Biochem. J. 82, 418 - 425
52. Schneider, Fr. & Wenck, H. (1969)
Hoppe Seyler's Z. Physiolog. Chemie 350, 1521 - 1530
53. Gorin, G., Martic, P.A. & Doughty, G. (1966)
Arch. Biochem. Biophys. 115, 593 - 597
54. Hollaway, A., Mathias, P. & Rabin, B.R. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 92, 111 - 124
55. Kail, M., Schneider, Fr. & Wenck, H. (1970)
Hoppe Seyler's Z. Physiolog. Chemie 351, 1280 - 1282.
56. Tanford, C. (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 4240 - 4247
57. Löffler, H.G. & Schneider, Fr. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 386, 221 - 232
58. Zahn, H., Wallemann, B. & Waschka, O. (1954)
Hoppe Seyler's Z. Physiolog. Chemie 294, 100 - 107

59. Howard, A.N. & Wild, F. (1957)
Biochem. J. 65, 651 - 659
60. Higgins, H.G. & Harrington, K.J. (1959)
Arch. Biochem. Biophys. 85, 409 - 425
61. Ramachandran, L.K. & Witkop, B. (1967)
Methods Enzymol. 11, 283 - 299
62. Witkop, B. (1961) Adv. Protein. Chem. 16, 221 - 321
63. Riordan, J.F. & Christen, P. (1968)
Biochemistry 7, 1525 - 1530
64. Williams, J. & Lowe, J.M. (1971)
Biochem. J. 121, 203 - 209
65. Bruice, T.C., Gregory, M.J. & Walters, S.L. (1968)
J. Am. Chem. Soc. 90, 1612 - 1619
66. Holbrook, J.J. & Ingram, V.A. (1973)
Biochem. J. 131, 729 - 738
67. Röhm, K.H. (1972) Dissertation, Marburg
68. Vallee, R.L. & Riordan, J.F. (1969)
Annu. Rev. Biochem. 38, 778 - 783
69. Mildvan, A.S. in The Enzymes, Kinetics and Mechanism
Vol. II, 3rd Edition Academic Press New York, London
70. Maurer, H.R. (1971) Disc-Electrophoresis S. 117 - 130
de Gruyter, Berlin
71. Vescia, A. & Traniello, S. (1962)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 38, 637 - 639
72. Moore, S. & Stein, W.H. (1948)
J. Biol. Chem. 176, 367 - 388
73. Takenaka, A., Susuki, T., Takenaka, O., Horinishi, H.
& Shibita, K. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 194, 293 - 300

74. Brandburg, A.F. & Smyth, D.G. (1973)
Biochem. J. 131, 637 - 642
75. Drèze, A. (1956)
Biochem. J. 62, 3 P
76. Löffler, H.G. (1974) Dissertation, Marburg
77. Means, G.E. & Feeney, R.E. (1971)
Chemical Modification of Proteins,
Holden - Day, Inc. San Francisco
78. Barman, T.E. & Koshland, Jr., D.E. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 5771 - 5776
79. Fsi Tschen-U. & Orechowitsch, V.N. (1958)
Biochimija 23, 772 - 779
80. Marshall, R., Birnbaum, S.M. & Greenstein, J.P. (1956)
J. Am. Chem. Soc. 78, 4636 -
81. Rao, K.R., Birnbaum, S.M., Kingsey, R.B. & Greenstein, J.P. (1952) J. Biol. Chem. 198, 507 - 523
82. Glazer, A.N. (1970)
Ann. Rev. Biochem. 39, 101 - 124
83. Stevens, M.F.G. (1975)
J. Chem. Soc. 1975, 1555 - 1556
84. Lin, Y., Means, G.E. & Feeney, R.E. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 789 - 793
85. Schoellmann, G. & Shaw, E. (1963)
Biochem. 2, 252 - 255
86. Segal, D.M., Powers, J.C., Cohen, G.H., Davies, D.R. & Willox, P.E. (1971). Biochem. 10, 3728 - 3737
87. Gertler, A. (1974). FEBS Letters 43, 81 - 84
88. Thompson, C. & Blout, E.R. (1973)
Biochem. 12, 44 - 47

89. Lipscomb, W.N., Reeke, G.N., Hartsuck, J.A.,
Quiocho, F.A. & Bethge, P.H. (1970)
Phil. Trans. Roy. Soc..Lond. B. 257, 177 - 214
90. Breslow, R. & Mc Clure, D. (1976)
J. Am. Chem. Soc. 98,1, 259 - 261

Lebenslauf

Am 25. 03. 1948 wurde ich, Werner Kördel, als Sohn des Kfz. Mech. Meisters Johannes Kördel und seiner Frau Anna, geb. Hunstein, in Friedigerode geboren.

Von Ostern 1954 bis Ostern 1959 besuchte ich zuerst die Volksschule in Friedigerode, danach ein Gymnasium, die Melanchthonschule in Steinatal. Dort legte ich 1967 das Abitur ab.

Nach der Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im SS 1969 das Studium der Chemie an der Philipps-Universität in Marburg.

Die Diplomchemiker-Vorprüfung legte ich 1971 und im April 1973 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ab. Vom Juni 1973 bis November 1973 arbeitete ich am Physiologisch-Chemischen Institut II der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider über kinetische und proteinchemische Untersuchungen an der Aminoacylase.

Die vorliegende Arbeit setzt diese Untersuchungen fort. Sie wurde ebenfalls unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider am Physiologisch-Chemischen Institut II der Philipps-Universität in der Zeit von Januar 1974 bis Februar 1976 durchgeführt.

